Ein Beitrag
zum
physiologischen Abbau der Fettsäuren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät

der

Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg i. Br.

verfaßt und vorgelegt

von

Anneliese Hachfeld

aus Treptow a/Rega

1934

Druck von Ludw. Flöttmann / Gütersloh i. Westf.

Referent: Prof. Dr. G. Fischer

Dekan: Prof. Dr. W. Soergel

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung des Vorstandes der organischen Abteilung am Chemischen Universitäts-Laboratorium Freiburg im Breisgau, Herrn Professor Dr. F. G. Fischer ausgeführt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer für das der Arbeit stets entgegengebrachte Interesse, seine vielen guten Ratschläge und große Hilfsbereitschaft herzlichst zu danken.

Inhalts-Verzeichnis.

I. Einleitung.

1. Untersuchung und bisherige Ergebnisse des Fettsäureabbaues 9
2. Mechanismus der β-Oxydation 10
3. Das Schicksal der Acetessigsäure 12
4. Abbaumöglichkeiten der höheren Ketosäuren im Organismus 13

II. Aufgaben der vorliegenden Arbeit 14

III. Methodik der ausgeführten Versuche 14

IV. Versuchsergebnisse . . . . . 15—34

A. Versuche mit normalen Fettsäuren . . . . . 15—19
1. Einwirkung von Hefe 15
2. Einwirkung von Leber 18

B. Versuche mit α-β ungesättigten Fettsäuren . . . 20—25
1. Manometrische Messungen mit Crotonsäure . . . 20
a) Einwirkung von Hefe 20
b) Einwirkung von Leber 20
2. Präparative Versuche 20
a) Versuche zum Nachweis einer Wasseranlagerung 20
α_1) Einwirkung von Hefe 21
α_2) Einwirkung von Hefe auf Crotonsäure in Gegenwart von Glukose 22
β) Einwirkung von Leber 22
b) Acetaldehydbildung aus Crotonsäure und β-Oxybuttersäure 24
c) Einwirkung von Hefe auf Acetaldehyd und Acetaldehyd-Kondensationsprodukte 24

C. Versuche mit β-Oxysäuren 25

D. Schicksal der Acetessigsäure . . . . . 26—32
1. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme von Acetessigsäure unter der Einwirkung von Hefe oder Leber . . . . . 26—28
a) Einwirkung von Hefe 26

b) Einwirkung von Leber 27
2. Dekarboxylierung der Acetessigsäure 28
3. Quantitative Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure . . . . . 28—32
I. Bestimmung nach der Methode von Huppert-Messinger 29
II. Kolorimetrische Bestimmung der Acetessigsäure mit Ferrichlorid . . . . . 29—32
a) Ausarbeiten der Methode 29
b) Bestimmung der Adsorption an Hefe oder Lebergewebe 30
c) Kolorimetrische Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure durch längere Einwirkung von Hefe oder Leber 31
1. Versuche mit Hefe 31
2. Versuche mit Rindsleber 31
3. Versuche mit Rattenleberschnitten . . . 31
d) Ergebnisse der Versuche mit Acetessigsäure 32
E. Versuche mit höheren β-Ketosäuren . . . . . 32—33
1. Darstellung der β-Ketosäuren 32
2. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme 33
3. Quantitative Bestimmung der Abnahme der β-Ketomyristinsäure 33
F. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse 34

V. Experimenteller Teil . . . . . 35—69
1. Methodisches zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahmen 35
2. Bereitung von verarmter Hefe 35
3. Versuche . . . . . 36—69
A. Beeinflussung der Atmung von Hefe durch tote Zellen 36
B. Versuche mit normalen Fettsäuren 37
1. Einwirkung von Hefe 37
2. Einwirkung von Leber 38
Versuche mit Rindsleber 39
Versuche mit Rattenleber 40
C. Versuche mit α-β ungesättigten Säuren 41
a) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme 41
1. Einwirkung von Hefe 41
2. Einwirkung von Leber 42
b) Präparative Versuche zur Wasseranlagerung an α-β ungesättigte Säuren 42
1. Einwirkung von Hefe 42

2. Einwirkung von Hefe bei Gegenwart von Glukose auf Crotonsäure 44
3. Einwirkung von Leberbrei auf Crotonsäure . 45
c) Versuche zur Acetaldehydabspaltung aus Crotonsäure 46
1. Kontrollen 46
2. Versuchsansätze 47
d) Einwirkung von Hefe auf Acetaldehyd und Acetaldehyd-Kondensationsprodukte 47
Darstellung des Kondensationsproduktes . . . 48
Bestimmung der Sauerstoffaufnahmen 48
D. Versuche mit β-Oxybuttersäure 49
Bestimmung der Sauerstoffaufnahme 49
1. Einwirkung von Hefe 49
2. Einwirkung von Leber 50
E. Schicksal der Acetessigsäure 50
a) Darstellung der Acetessigsäure 50
1. Verseifung mit methylalkoholischer Kalilauge 50
2. Verseifung in wässriger Lösung 50
b) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme 51
1. Einwirkung von Hefe 51
2. Versuche mit Rindsleberschnitten 52
3. Versuche mit Rattenleberschnitten 53
c) Dekarboxylierung der Acetessigsäure 54
1. Bestimmung der Kohlensäure-Entwicklung . 54
2. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme von Aceton 55
d) Quantitative Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure 55
I. Bestimmung nach Huppert-Messinger . . . 55
II. Kolorimetrische Bestimmung mit der Eisenchloridmethode 56
a) Ausarbeiten der Methode 56
1. Einfluß der zugegebenen Menge Fe Cl_3 56
2. Einfluß der Acetessigsäure-Konzentrationen 57
3. Einfluß von Phosphat auf die Genauigkeit der Bestimmung 57
Versuch 1 57
Versuch 2 58
Versuch 3 58
4. Bestimmung der Adsorption an Hefe und Lebergewebe 59
α) Adsorption an Hefe 59
β) Adsorption an Rindsleber 59
γ) Adsorption an Rattenleber 60

b) Versuche zur Bestimmung des Abbaues der Acetessigsäure durch Hefe oder Leber 60
1. Versuche mit Hefe 60
2. Versuche mit Schnitten von Rindsleber 63
3. Versuche mit Rattenleberschnitten . . 66

F. Versuche mit höheren β-Ketosäuren 66
a) Darstellung der β-Ketomyristinsäure 66
1. β-Ketomyristinsäureester 66
2. Verseifung des Esters 67
b) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme 67
c) Quantitative Bestimmung der Abnahme der β-Ketomyristinsäure 67

VI. Literatur-Verzeichnis . . . . . 71—73

I. Einleitung.

1. Untersuchung und bisherige Ergebnisse des Fettsäureabbaues.

Durch drei Arbeitsrichtungen wurden bisher unsere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Erforschung des physiologischen Fettsäureabbaues gefördert. Die erste Richtung beschäftigte sich mit Fütterungsversuchen mit phenylierten Fettsäuren[1,2,3]), die bei der Verbrennung im Organismus leicht faßbare und identifizierbare Reste ergaben. Nach ihrer Fütterung ließen sich nämlich Abbauprodukte, die den Benzolkern enthielten, teils als solche, teils mit Glykokoll gepaart, aus dem Harn isolieren. Man erhielt folgende Ergebnisse[4]):

1. Endständig phenylierte Fettsäuren mit geradzahliger normaler C-Kette wurden in Fütterungsversuchen meist bis zur Phenylessigsäure abgebaut, im Harn ausgeschieden.
2. Endständig phenylierte Fettsäuren mit ungeradzahliger normaler C-Kette wurden dagegen zu Benzoësäure abgebaut.

In einigen Fällen wurden auch weniger weit abgebaute Phenylfettsäuren aus dem Harn isoliert. In allen Fällen waren aber die ausgeschiedenen Fettsäuren um eine gerade Anzahl C-Atome verkürzt. Diese Tatsache faßte Knoop im Begriff der sogenannten β-Oxydation zusammen.

Durchströmungsversuche[5, 6]) an isolierter Leber mit normalen und verzweigten Fettsäuren ließen die gleichen Gesetzmäßigkeiten erkennen. Auf der Suche nach den Muttersubstanzen der bei den Strömungsversuchen gebildeten Acetessigsäure und des daraus entstehenden Acetons[7, 8, 72]) erwiesen sich aliphatische Fettsäuren mit mindestens 4 C-Atomen in geradzahliger Kette und Aminosäuren mit mindestens 5 C-Atomen in ungeradzahliger Kette als Acetessigsäurebildner[9]). Bei Fettsäuren mit ungerader C-Atomzahl läßt sich dagegen keine Bildung von Acetessigsäure feststellen[8, 10]). Durch paarigen Abbau werden demnach die geradzahligen aliphatischen Fettsäuren (analog dem Abbau der entsprechenden fettaromatischen Säuren zu Phenylessigsäure) letzten Endes zu C_4-Körpern umgewandelt.

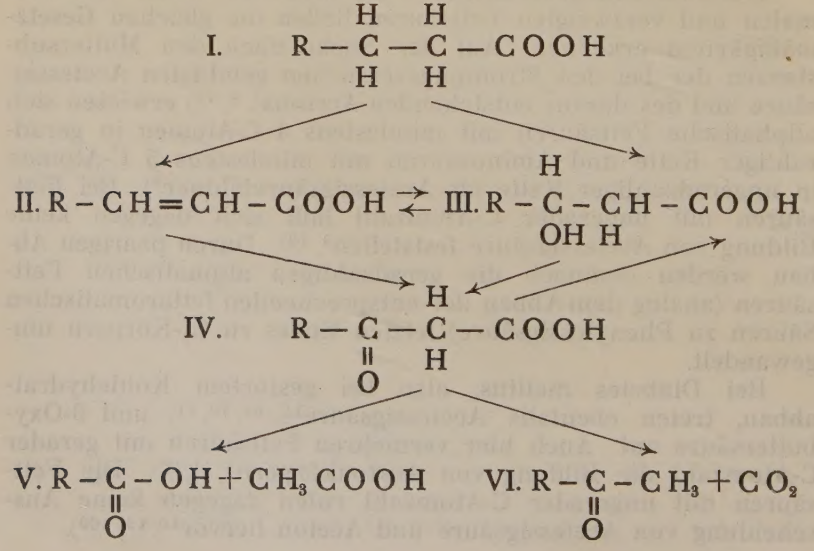
Bei Diabetes melitus, also bei gestörtem Kohlehydratabbau, treten ebenfalls Acetessigsäure[11, 68, 70, 71]) und β-Oxybuttersäure auf. Auch hier vermehren Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl die Bildung von Acetonkörpern[8, 11, 12]). Die Fettsäuren mit ungerader C-Atomzahl rufen dagegen keine Ausscheidung von Acetessigsäure und Aceton hervor[10, 13, 100]).

Trotz dieser Bestätigung der Knoopschen Theorie machten sich noch Einwände gegen eine β-Oxydation im tierischen Organismus geltend[14, 15]), da keine rein chemischen Analogiereaktionen vorlagen, bei denen sich das zur Carboxylgruppe β-ständige C-Atom durch Reaktionsfähigkeit auszeichnete. Es hatte sich bis dahin nur das α-ständige C-Atom zu Umsetzungen und Substitutionen fähig gezeigt. Diesem Einwand konnte Dakin entgegentreten[16]). Es ist ihm gelungen, in vitro mit Wasserstoffperoxyd eine β-Oxydation zu erzielen und dieselben Abbauprodukte zu erhalten, wie sie im tierischen Organismus auftreten.

Alle drei Untersuchungsmethoden führten also zu dem Ergebnis, daß aus den normalen Fettsäuren immer eine gerade Anzahl von C-Atomen abgespalten wird, sodaß jeweils eine um mindestens zwei C-Atome ärmere Fettsäure entsteht.

2. Mechanismus der β-Oxydation.

Die von Knoop aufgestellte Theorie der β-Oxydation besagt nur, daß der Fettsäureabbau im Organismus so verläuft, daß jeweils zwei C-Atome auf einmal abgespalten werden. Im Zusammenhang mit ihr steht auch das ausschließliche Vorkommen der Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl bei Pflanzen und Tieren, was nur durch paarigen Abbau und Aufbau erklärlich ist. Der Mechanismus dieses Abbaus und Aufbaus ist jedoch bis heute noch nicht endgültig geklärt, obwohl verschiedene Theorien aufgestellt wurden. Die für den Abbau diskutierten Möglichkeiten sollen an nachstehendem Schema erläutert werden:



Die größte Wahrscheinlichkeit besitzt wohl die Dehydrierungstheorie, die zuerst von Dakin[30]) ausgesprochen und hauptsächlich von Wieland[23], [24]) weiter ausgebaut wurde. Nach ihr besteht der erste Angriff im Organismus auf die Fettsäuren (I) in einer α-β-Dehydrierung (II), an die ungesättigte Bindung wird dann Wasser angelagert (III) und als nächste Stufe wird die β-Oxysäure zur Ketosäure dehydriert (IV), die dann einer weiteren Veränderung unterliegt, entweder durch Spaltung (nach V oder VI) oder Synthese.

Zahlreiche Versuchsergebnisse können diese Dehydrierungstheorie stützen, u. a.[73]). Bei Verfütterung von niederen phenylierten Fettsäuren wurden aus dem Harn ungesättigte Säuren isoliert[16]). Daneben ließen sich auch andere Oxydationsstufen der Säuren feststellen, sodaß der Übergang von ungesättigten in Oxy- und Ketosäuren möglich erscheint (von II in III und IV), zumal diese als Zwischenprodukte auftretenden Säuren bei Verfütterung dieselben Endprodukte liefern[4]) wie die ursprünglichen Säuren. Diesem Schema des ersten Angriffs auf die Fettsäuren analog findet der Abbau der Bernsteinsäure im Muskelgewebe statt[26], [27]). Hier wurden Furmarsäure, Äpfelsäure[28]) und die dieser Oxysäure entsprechende Ketosäure, Oxalessigsäure[29]) nachgewiesen. Es ist aber noch die Frage, ob das Auftreten von ungesättigten Säuren im Organismus auf direkte Dehydrierung der Fettsäuren zurückzuführen ist[25]).

Andrerseits sprechen eine Reihe von Tatsachen gegen die Dehydrierungstheorie bei dem Fettsäureabbau. Phenylierte β-Oxysäuren werden vom Organismus schwerer angegriffen[30], [74]) als die entsprechenden β-Ketosäuren, deshalb erscheint es unsicher, daß Oxysäuren die Vorstufen der Ketosäuren bilden sollen. Da sich nach den Erfahrungen mehrerer Autoren im Organismus zwischen Keto- (IV) und Oxysäure (III) ein Gleichgewicht einstellt unabhängig davon, welche von den beiden Säuren zum Versuch verwendet wird, und zwar zugunsten der reduzierten Stufe (Oxysäure)[31]), könnte diese ebensogut sekundär aus der Ketosäure entstehen[32]).

Dann liegen wiederum Ergebnisse mit isolierter Leber vor, nach denen β-Oxybuttersäure leicht zu Acetessigsäure oxydiert wird (III→IV)[8], [43], [44], [45]). Bei einem andern Versuch führt eine Injektion von β-Oxybuttersäure bei hungernden Tieren, nicht wie die von Buttersäure, zu einer Vermehrung der Acetessigsäureausscheidung[34]). Nach diesem letzten Ergebnis wäre β-Oxybuttersäure nicht aus der Fettsäure (oder der ungesättigten Säure), sondern sekundär aus der Acetessigsäure durch Reduktion entstanden (III←IV).

Bei Fütterungsversuchen mit phenylierten Ketosäuren läßt sich nicht nur die zur Oxysäure reduzierte Stufe isolieren, sondern auch die entsprechende ungesättigte Säure[33]).

Auf Grund all dieser Tatsachen wird oft die Möglichkeit diskutiert, daß die einzelnen Oxydationsstufen: ungesättigte Säuren, Oxy- und Ketosäuren miteinander im reversiblen Gleichgewicht stehen[36]). Dakin spricht auf Grund seiner Versuche mit Capronsäure[35]) davon, daß vielleicht jede Oxydationsstufe direkt aus der Fettsäure entstehen könne, und sich dann ein Gleichgewicht mit den beiden andern Formen einstelle, daß also bis jetzt keine bestimmte Reihenfolge der Oxydationsstufen feststehe.

Hinsichtlich des ersten Angriffes auf das Fettsäuremolekül läßt sich auf Grund all dieser Versuchsergebnisse keine bestimmte Aussage machen. Wenn sich tatsächlich ein reversibles Gleichgewicht einstellt, ist es nicht möglich, die einzelnen Reaktionsprodukte in ihrer Reihenfolge festzulegen. Wahrscheinlich ist der Weg des Abbaues stark abhängig von den jeweiligen Bedingungen, z. B. von der Sauerstofftension[18]).

Eine neuere Theorie glaubt Phosphatidverbindungen als Zwischenprodukte des Fettsäureabbaues annehmen zu dürfen[37], [38], [39]). Vor allem Jost[42]) sucht Beweise, daß in Phosphatiden gebundene Fettsäuren für den Organismus leichter angreifbar sind[40], [41]). Er stellte bei Durchströmungsversuchen mit isolierter Hundeleber fest, daß zugesetztes Phosphatid rasch von der Leber aufgenommen wird, und daß dabei Sauerstoffaufnahme stattfindet. In der glykogenfreien Leber läßt sich dabei starke Acetessigsäurebildung beobachten; in der glykogenreichen tritt eine solche auch auf, ist jedoch bedeutend geringer.

3. Das Schicksal der Acetessigsäure.

Aus dem Auftreten der Acetessigsäure als Produkt der Fettverbrennung bei gestörtem Kohlehydratabbau im Organismus läßt sich der Schluß ziehen, daß sie beim normalen Stoffwechsel die Rolle eines Intermediärproduktes spielt, das sich nicht erfassen läßt. Da Ketonurie auch durch kohlehydratfreie, aber fettreiche Nahrung erzeugt werden kann, so versuchte man, die Vermehrung der Acetonkörper bei mangelndem Kohlehydratabbau mit der Annahme zu erklären, daß die Fette gewissermaßen im Feuer der Kohlehydrate verbrennen[59], [60], [86]). Man suchte unter Annahme der Arbeitshypothesen, daß Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure normale Stoffwechselprodukte seien, ihr weiteres Schicksal zu klären. Als gesichertes Ergebnis kann bis jetzt betrachtet werden, daß, wenn normalerweise Acetessigsäure entsteht, sie keine Ketonspaltung erleidet; denn Aceton, das hierbei auftreten müßte[9], [46]), wird im Orga-

nismus und in Modellversuchen niemals angegriffen[47, 48]). Durch Säurespaltung würden dagegen zwei Moleküle Essigsäure entstehen. Von dieser weiß man, daß sie leicht verbrannt wird[20, 21]); es ist aber niemals gelungen, sie nachzuweisen[17, 18, 19]). Dies kann jedoch leicht so erklärt werden, daß sie viel rascher weiter umgewandelt wird, als sie entsteht, sei es durch Oxydation oder durch schnell verlaufende Synthesen[23, 29, 49-54]). Im Durchströmungsversuch mit Leber wurde Resynthese von Essigsäure zu Acetessigsäure festgestellt[49, 50]). Dann wurde in mehreren Fällen die synthetische Umwandlung von Essigsäure durch Mikroorganismen beobachtet[101]). Außerdem fand man, daß Essigsäure durch Dehydrierung Bernsteinsäure zu liefern vermag[23, 24, 29, 54, 75]).

Da es jedoch trotz der Berücksichtigung dieser theoretischen Abbaumöglichkeiten nicht gelang, einen wirklichen Abbau von Acetessigsäure in der Leber zu beweisen, suchte man nach andern Reaktionsmöglichkeiten. Dabei wurde hauptsächlich der Übergang von Acetessigsäure in Kohlehydrate diskutiert. Hier müssen vor allem die Arbeiten von Henze[57, 58]) und die theoretischen Überlegungen von Geelmuyden[61, 68]) erwähnt werden, die die Fettverbrennung und den Zuckerabbau[59, 86]) in gewisse Beziehungen miteinander setzten. Aus Methylglyoxal und Acetessigsäure entstand ein Ketol[62]), das bei Fütterungsversuchen vollständig verschwand und auch bei Versuchen mit Leber nicht wiedergewonnen werden konnte. Durch diese Reaktion ließe sich die so oft beobachtete antiketogene Wirkung der Kohlehydrate erklären.

4. Abbaumöglichkeiten der höheren Ketosäuren im Organismus.

Während das Auftreten der Acetessigsäure als Produkt der Fettoxydation im gestörten Stoffwechsel feststand, gelang es niemals, höhere β-Ketosäuren nachzuweisen. In Analogie zur Bildung von Acetessigsäure aus Buttersäure, müßte jedoch angenommen werden, daß auch die höheren Fettsäuren über die Zwischenstufe der β-Ketosäuren abgebaut werden; für diese selbst gibt es dann genau wie für die Acetessigsäure die zwei Wege der Säure-[66]) und der Ketonspaltung[64, 65]) als weiteren Abbau. Obgleich bei höheren Ketosäuren in vitro die Ketonspaltung bevorzugt eintritt[69]), erscheint im Organismus die Säurespaltung viel wahrscheinlicher[67]), da die Methylketone vom Organismus schwer angegriffen werden und wesentlich giftiger sind als die entsprechenden β-Ketosäuren.

II. Aufgaben der vorliegenden Arbeit.

Aus dem Ergebnis der besprochenen Arbeiten ergaben sich für unsere Fragestellung folgende Gesichtspunkte:

Die von Knoop als β-Oxydation bezeichnete Tatsache des paarigen Abbaues der Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl kann als gesichert betrachtet werden. Hingegen ist der Mechanismus des ersten Angriffes und die Reihenfolge des Entstehens der Abbauprodukte noch nicht bekannt. Eine Aufklärung des Mechanismus ist dadurch zu erhoffen, daß man das Verhalten der angenommenen Zwischenprodukte prüft. Die vorausgesetzte Bildung einer α-β-ungesättigten Säure ließe sich prüfen durch die Untersuchung ihres Verhaltens, wobei sowohl die Möglichkeit der Wasseranlagerung als auch die der direkten Oxydation zu untersuchen wäre. Eine oxydative Veränderung ließe sich durch Messen der Sauerstoffaufnahme und durch quantitative Bestimmung der Abnahme der Säuren nachweisen.

Bei der Untersuchung des Säureabbaues, insbesondere der β-Oxysäuren, ist zu prüfen, ob Acetaldehydbildung stattfindet, vor allem aus β-Oxybuttersäure und aus Crotonsäure. Findet nämlich Kettenverkürzung unter Bildung von Acetaldehyd statt, so könnten die Acetonkörper ebensowohl einer Aldolkondensation mit nachfolgender Oxydation ihre Entstehung verdanken. Sie wären dann in diesem Falle Aufbauprodukte, während sie nach den bisherigen Theorien die Rolle von Abbauprodukten spielten.

Ferner müßte geprüft werden, welche Veränderungen β-Ketosäuren erleiden, gleichgültig, ob sie durch direkte Oxydation der ungesättigten Säuren oder über die Oxysäuren entstanden sind. Unter ihnen gilt die Untersuchung in besonderer Weise der Acetessigsäure selbst und den weiteren Umwandlungsprodukten ihrer Spaltstücke. In Betracht kommen Essigsäure einerseits und Aceton andererseits, deren Verhalten eingehender Prüfung zu unterziehen wäre.

III. Methodik der ausgeführten Versuche.

Da für den Fettsäureabbau im Organismus vor allem die Leber in Betracht kommt, wurden die zu untersuchenden Säuren als Na-Salze zu Leberextrakten, Leberbrei und Suspensionen von Leberschnitten in Pufferlösungen gegeben. Zunächst

diente uns hierfür Rindsleber, die wenige Stunden nach der Schlachtung verarbeitet wurde. Für die späteren Versuche, vor allem die Untersuchungen der Acetessigsäure, wurde die Leber von frisch geschlachteten Ratten verwendet.

In anderen Versuchen wurde mit Hefe gearbeitet, da diese ebenfalls einen lebhaften Fettstoffwechsel aufweist.

Zur Messung des Gasstoffwechsels benutzten wir die manometrische Barcroft-Warburg-Methode[80, 91]), die es ermöglicht, bereits einen Umsatz von wenigen cmm zu bestimmen.

Für die Bestimmung der Ketosäuren wurde eine kolorimetrische Methode ausgearbeitet.

IV. Versuchsergebnisse.

A. Versuche mit normalen Fettsäuren.

1. Einwirkung von Hefe.

Da zum Studium des Abbaues von Säuren mit Erfolg Hefe, der ein lebhafter Fettstoffwechsel zugeschrieben wird, herangezogen wurde, verwendeten wir für einen Teil unserer Untersuchungen über den Abbau der Fettsäuren ebenfalls Hefe. Es war zu prüfen, ob unter ihrer Einwirkung überhaupt eine oxydative Veränderung der zugefügten Fettsäuren stattfindet. Da sich aber sowohl die Bestimmung der Oxydationsprodukte wie die der Abnahme der Fettsäuren schwer durchführen läßt, wählten wir die empfindlichste, quantitative Methode zur Verfolgung der Oxydation in biologischen Systemen, nämlich die Messung der Sauerstoffaufnahme in der Barcroft-Warburg-Schüttelapparatur[80]).

Die Oxydierbarkeit der Essigsäure durch Hefe ist bereits bekannt[75, 80]). Wir prüften nun, ob sich das Verhalten anderer Fettsäuren dem der Essigsäure anschließt, und untersuchten Na-Salzlösungen von Propion-, Butter-, Adipin-, Bernstein- und Stearinsäure. Für die Sauerstoffaufnahme der einzelnen Säuren erhielten wir beträchtliche Unterschiede. Auffallend ist zunächst, daß die Essigsäure eine Kurve von ganz anderem Charakter ergibt wie die übrigen Säuren. Man sieht ohne weiteres ein zunächst rasches, nahezu lineares Ansteigen, dann,

nach Aufnahme von drei Atomen Sauerstoff, eine fast vollständige Abflachung der Kurve. Im Ganzen werden, unter Berücksichtigung der nicht meßbaren Aufnahme in den ersten 15 Minuten, rund 4 Atome Sauerstoff aufgenommen. Dies entspräche einer vollständigen Oxydation zu Kohlensäure und Wasser.

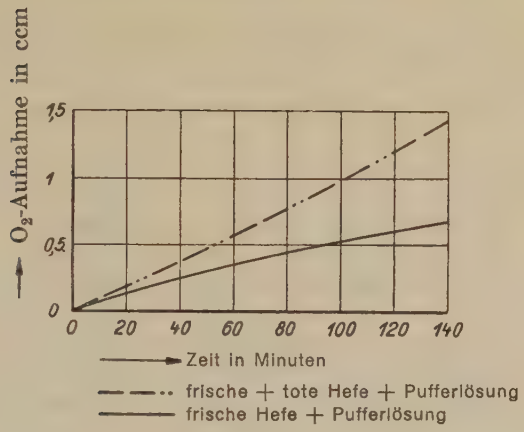
Im Gegensatz zur Essigsäure erhielten wir für die Sauerstoffaufnahme der anderen Säuren nur sehr allmählich ansteigende Kurven. Propionsäure hat nach 3 Stunden 1 Atom Sauerstoff aufgenommen, während der Sauerstoffverbrauch der Buttersäure in der gleichen Zeit nur den dritten Teil und derjenige der Adipinsäure nur die Hälfte beträgt. Diese so geringe Steigerung der Sauerstoffaufnahme über längere Zeiten hinaus berechtigt zu dem Schluß, daß diese Säuren durch Hefe oxydativ nicht angegriffen werden, selbst aber auch keinen Einfluß auf Hefe ausüben.

Bernsteinsäure zeigt nach drei Stunden einen Sauerstoffverbrauch von nahezu zwei Atomen. Die Sauerstoffaufnahme dieser Säure ist bereits durch die Arbeit von Wieland und Sonderhoff geklärt[75]).

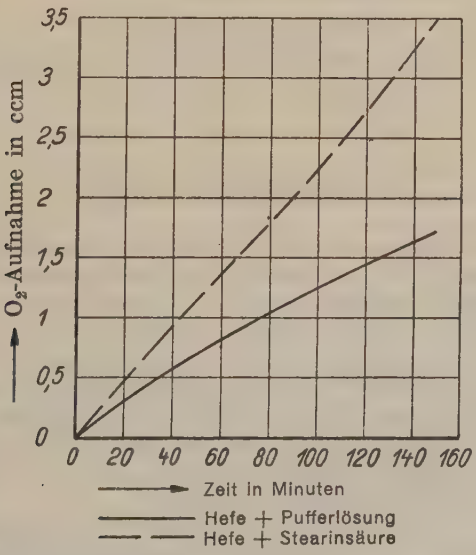
Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Säuren steht die Stearinsäure; auch sie zeigt anfänglich eine sehr langsam ansteigende Sauerstoffaufnahme, nach 3 Stunden ist aber ungefähr dieselbe Geschwindigkeit wie bei der Essigsäure erreicht. Es bestehen zwei Möglichkeiten, um diesen andersartigen Kurvenverlauf für die Stearinsäure gegenüber den anderen Säuren zu erklären. Die Anfangsgeschwindigkeit kann auf die Stearinsäure selbst zurückzuführen sein, während durch die zunehmende Sauerstoffaufnahme in gesteigertem Maße die Beteiligung zunächst entstandener Reaktionsprodukte zum Ausdruck käme. Da aber die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme erst nach 1½ Stunden zunimmt, dann jedoch rasch ansteigt, wird vielmehr die Annahme bestätigt, daß es sich um eine teilweise Schädigung der Hefe durch Stearinsäure und um durch geschädigte Zellen ermöglichte verstärkte Atmung noch lebender Hefe handelt. Einen Beweis für diese Annahme liefert ein Parallelversuch mit Hefe allein, der zeigt, daß die Sauerstoffaufnahme der Hefe um das Doppelte gesteigert wird, sobald ihr tote Zellen zugeführt werden. Wir finden dabei denselben Kurvenverlauf wie für Stearinsäure nach 1½ Stunden. Dies läßt den Schluß zu, daß auch Stearinsäure von Hefe oxydativ nicht angegriffen wird.

Die Na-Salzlösungen der untersuchten Säuren werden, mit Ausnahme von Essig- und Bernsteinsäure, unter den von uns gewählten Bedingungen von Hefe oxydativ nicht angegriffen.

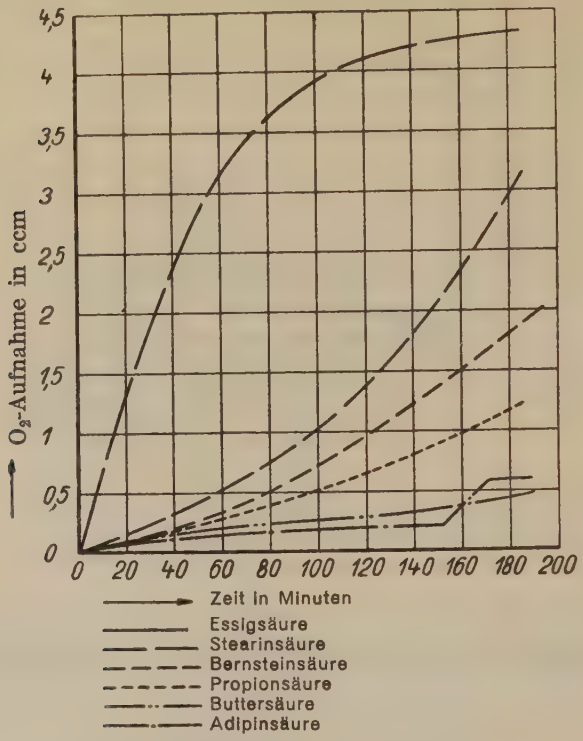
Beeinflussung der Atmung von lebender Hefe durch tote Hefezellen.



Zum Vergleich: Sauerstoffaufnahme von Hefe und Stearinsäure.



Sauerstoffaufnahme der untersuchten normalen Fettsäuren.



(Eigenatmung der Hefe
ist bei den einzelnen Säuren bereits abgezogen)

2. Einwirkung von Leber.

Das Verhalten normaler Fettsäuren gegenüber Leber hatte bereits Embden[7, 8]) in seinen Durchströmungsversuchen geprüft. Es traten dabei Acetonkörper als Endprodukte auf; auf welchem Wege diese aus dem Fettsäuremolekül entstanden waren, konnte er nicht nachweisen. Zu diesem Zweck untersuchte Quagliariello[89, 90]), ob höhere Fettsäuren von sauerstoffgesättigter Galle oder Leber oxydativ angegriffen werden, am Beispiel der Stearin- und Palmitinsäure. Für 1 ccm einer gesättigten Na-Stearatlösung erhält er nach 75 Minuten eine Sauerstoffaufnahme von 0,14 ccm.

Unsere Versuche wurden mit dem Ziel unternommen, die Frage zu klären, ob unter der Einwirkung von Leber der erste

Angriff auf das Fettsäuremolekül oxydativ erfolgt, wie es Quagliariello fand.

Wir untersuchten zunächst Essigsäure unter der Einwirkung von Schnitten von Lebern ganz frisch geschlachteter Ratten. Von Essigsäure ist bekannt, daß sie vom Organismus angegriffen wird[20, 21]; ihre Umwandlung in Bernsteinsäure wurde mehrmals nachgewiesen[23, 24, 29, 54]; ob diese unter Sauerstoffaufnahme stattfindet, wurde dagegen noch nicht geprüft. In unseren Versuchen erhielten wir für 1 Mol Essigsäure nach 90 Minuten eine Aufnahme von 0,1 Mol Sauerstoff, das heißt $^1/_3$ bis $^1/_5$ mal mehr Sauerstoff, als in der gleichen Zeit vom Gewebe selbst verbraucht wurde. Nach diesen Ergebnissen können wir den Schluß ziehen, daß der auf Essigsäure erfolgende Angriff oxydativer Natur ist.

Von höheren Fettsäuren wurden Palmitin- und Stearinsäure untersucht und zunächst der Einwirkung von Rindsleberschnitten ausgesetzt; dann wurde anstelle von Schnitten Leberbrei verwendet. Für beide Fälle erhielten wir mit einer einzigen Ausnahme in keinem der zahlreichen Versuche eine Sauerstoffmehraufnahme für die Fettsäuren. Der Sauerstoffverbrauch war im Kontroll- und Hauptversuch nahezu gleich.

Nach den Erfahrungen Quagliariellos mit sauerstoffgesättigter Galle[89]) und Leber[90]) untersuchten wir nun, ob sich mit Leberbrei, der durch 1—30stündiges Einleiten von Sauerstoff verarmt, und dem Palmitin- und Stearinsäure zugesetzt wurde, eine, durch die Fettsäuren bedingte, Sauerstoffmehraufnahme nachweisen ließ. Diese Versuche ergaben zwar eine wesentlich geringere Eigenatmung als die früheren, aber der Sauerstoffverbrauch der Ansätze mit fettsauren Salzen blieb, im Gegensatz zu den Ergebnissen Quagliariellos, hinter dieser geringen Eigenatmung noch zurück.

Die Ölsäure, die zum Vergleich herangezogen wurde, zeigte in einigen Versuchen mit Leberschnitten und solchen mit O_2-gesättigtem Lebersaft eine geringe Sauerstoffmehraufnahme, die jedoch in allen Fällen unter 0,05 Mol pro Mol Säure in zwei Stunden blieb. Der Unterschied der Ölsäure gegenüber den anderen Säuren muß unter diesen Bedingungen wohl ihrer Doppelbindung zugeschrieben werden.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, gelang es uns in keiner Weise, die Quagliariello'schen Befunde mit Leber zu reproduzieren, nämlich nachzuweisen, daß höhere Fettsäuren durch sauerstoffgesättigtes Lebergewebe oxydativ angegriffen werden. Mit Ausnahme von essigsaurem Na und Na-Oleinat, als ungesättigter Säure, gelang es uns nicht, in vitro eine Oxydation normaler Fettsäuren mit Hilfe von Leber nachzuweisen. Somit können wir zwischen unseren Leber- und Hefeversuchen recht gute Übereinstimmungen feststellen.

B. Versuche mit α-β ungesättigten Fettsäuren.

1. Manometrische Messungen mit Crotonsäure.

Als erstes theoretisch mögliches Abbauprodukt normaler Fettsäuren kommen die α-β ungesättigten Säuren in Frage. Deshalb wurde deren weiteres Verhalten gegenüber Hefe und Leber zunächst hinsichtlich ihrer Oxydationsfähigkeit geprüft.

a) Einwirkung von Hefe.

Die Sauerstoffaufnahme wurde für α-β ungesättigte Säuren nur am Beispiel der Crotonsäure untersucht. Zum Vergleich wurde, wie immer, die Eigenatmung herangezogen, außerdem ein Ansatz mit Essigsäure, um die Wirksamkeit der Hefe zu kontrollieren. Obgleich sich die Hefe der Essigsäure gegenüber stark wirksam erwies, zeigte der Ansatz mit Crotonsäure keine größere Sauerstoffaufnahme als der Eigenatmungsversuch. Crotonsäure wird demnach also von Hefe nicht oxydativ angegriffen.

b) Einwirkung von Leber.

In einem Versuch zur Messung der Sauerstoffaufnahme von Crotonsäure mit Rindsleberschnitten stellten wir einen nur wenig höheren Sauerstoffverbrauch fest als für das Gewebe allein. Da die Sauerstoffaufnahme im Höchstfall für 1 Mol Säure $^1/_{42}$ Mol beträgt, läßt sich nach unseren Befunden sagen, daß oxydativ keine Veränderung der Crotonsäure durch Leber stattfindet, daß also, wenn überhaupt ungesättigte Säuren entstehen, sie unter den von uns gewählten Bedingungen als Zwischenprodukte wohl nicht in Frage kommen.

2. Präparative Versuche.

a) Versuche zum Nachweis einer Wasseranlagerung.

Durch die Arbeiten von Batelli und Stern, Wieland und anderen[22, 23, 28, 29]) ist es bekannt, daß Fumarsäure im Muskelgewebe Hydratation zu Äpfelsäure erleidet und diese zu Oxalessigsäure dehydriert werden kann. Zwischen den drei genannten Säuren stellt sich ein Gleichgewicht ein. Wir prüften nun, ob analog diesem Schema die beim Fettsäureabbau als

Intermediärprodukte in Betracht kommenden α-β ungesättigten Säuren unter Einwirkung von Hefe oder Leber in gleicher Weise durch Wasseranlagerung β-Oxysäuren zu liefern vermögen.

α_1) Einwirkung von Hefe.

Wir verwendeten für unsere Versuche untergärige Bierhefe mit zimtsaurem, crotonsaurem und fumarsaurem Na. Falls Oxysäuren entstehen, liegen diese nicht als racemisches Gemisch in biologischen Systemen vor, sondern es wird vorwiegend eine optisch aktive Form der Säure gebildet; deshalb wurden zu ihrem Nachweis die optischen Drehungen der filtrierten oder zentrifugierten wässerigen Lösungen der Reaktionsprodukte bestimmt. Die Meßgenauigkeit des von uns verwendeten Polarimeters betrug $\pm$ 0,05°. Die Drehwerte waren für Zimtsäure und Fumarsäure im Vakuum oder unter Stickstoff deutlich größer als — 0,05°. In Kontrollversuchen, einmal mit Hefe ohne Substrat, dann mit gekochter Hefe und der entsprechenden Säure, ließ sich keine optische Drehung feststellen. Bei Durchführung der gleichen Versuche unter Sauerstoff trat weder in den Haupt- noch in den Kontrollversuchen eine solche auf. Wurden jedoch die angesäuerten wässerigen Lösungen mehrere Stunden der Ätherextraktion unterzogen, so waren die Ätherauszüge nicht optisch aktiv. Da Oxysäuren durch Äther extrahiert werden müßten, lagen in den optisch aktiven Substanzen keine solchen vor. Es findet demnach keine einfache Hydratation von Zimt- und Fumarsäure statt.

In den Versuchen mit Crotonsäure gelang es weder unter Sauerstoff noch unter Stickstoff eine Drehung und dadurch Wasseranlagerung nachzuweisen. Es ließ sich keine β-Oxybuttersäure feststellen.

Um nun zu prüfen, ob die angewandten α-β ungesättigten Säuren von Hefe überhaupt angegriffen werden, versuchten wir nach Beendigung der Versuche dieselben wiederzugewinnen. Aus Versuchen mit frischer Hefe konnten Croton- und Zimtsäure zum größten Teil unverändert wiedergewonnen werden, von Fumarsäure jedoch nur der fünfte Teil. Aus Kontrollversuchen mit gekochter Hefe ließen sich die ungesättigten Säuren nicht wieder isolieren. Die schwere Isolierbarkeit ist durch das große Adsorptionsvermögen der Hefe zu erklären. Sollte der geringe adsorbierte Anteil verändert werden, so sind dies für Crotonsäure jedenfalls nicht nachweisbare Mengen, die vernachlässigt werden können.

In diesen Hefeversuchen gelang es uns in keiner Weise, Hydratation α-β ungesättigter Säuren nachzuweisen.

α_2) Einwirkung von Hefe auf Crotonsäure in Gegenwart von Glukose.

Folgende Versuche wurden mit dem Ziel unternommen, an Crotonsäure als Intermediärprodukt die Theorie der Verquikkung des Fettsäureabbaues mit dem Kohlehydratabbau zu prüfen. Sie schlossen sich in ihren Bedingungen denen von Friedmann[78]) über Einwirkung von Hefe auf acetessigsaures Na an und unterschieden sich von unseren früheren Versuchen durch Zusatz von Glukose in wechselnden Mengen. Ferner wurde die Hefe statt in wässeriger Suspension in gepufferten Lösungen vom p_H = 3,5 verwendet. Außerdem wurde das Verhältnis von Crotonsäure zu Hefe variiert. Die Aufarbeitung wurde wie früher beschrieben durchgeführt.

In einem Versuche drehte die wässerige Lösung des Ätherextraktes — 0,12°. In den Kontrollversuchen mit Crotonsäure allein und mit Traubenzucker allein war keine Drehung nachzuweisen. (Ein anderer Versuch mit einer ungefähr achtfach geringeren Konzentration der Crotonsäure im Gemisch zeigte keine Drehung. Der zu erwartende Wert liegt allerdings innerhalb der Fehlergrenze.) Die im ersten Versuch erhaltene Drehung würde, auf entstandene β-Oxybuttersäure umgerechnet, einer Umwandlung von 19 % Crotonsäure entsprechen. Da Hefe aber (nach Friedmann) rechtsdrehende β-Oxybuttersäure liefert, kann die entstandene Drehung wohl kaum auf diese Säure zurückgeführt werden, und wir haben es hier vielmehr mit einer aus Hefe entstandenen, nicht näher untersuchten, optisch aktiven Substanz zu tun. Wir können somit aus unseren Versuchsergebnissen den Schluß ziehen, daß auch in Gegenwart von Glukose Hefe keine Wasseranlagerung an α-β ungesättigte Säuren zu bewirken vermag.

β) Einwirkung von Leber.

Nachdem es unter der Einwirkung von Hefe auch in Gegenwart von Glukose nicht gelungen war, Hydratation an α-β ungesättigten Säuren nachzuweisen, griffen wir auf die von Friedmann ausgeführten Versuche mit Leber und Crotonsäure zurück[79]). Friedmann glaubt, einwandfrei Wasseranlagerung an Crotonsäure durch sechsstündige Digestion mit Leberbrei feststellen zu können. Er erhält bei seinen Versuchen unter Sauerstoff optische Drehungen der Ätherextrakte von — 0,05°. Dieser Wert entspricht 50 mg β-Oxybuttersäure (aus 1 g Crotonsäure Ausgangsmaterial). Der einzige Nachweis dafür, daß β-Oxybuttersäure vorliegt, wird erbracht durch Überführen in Crotonsäure; es ist indessen sehr schwierig, unangegriffene Crotonsäure mit Sicherheit von der β-Oxybuttersäure abzutrennen.

In den Kontrollversuchen unter Kohlensäure erhält Friedmann keine optischen Drehungen der Ätherauszüge. Er zieht daraus den Schluß, daß Kohlensäure die Fähigkeit des Leberbreies, Hydratation zu bewirken, aufhebt.

Wir wiederholten nun die Versuche von Friedmann, verwendeten jedoch statt steril gewonnener Hundeleber schlachtfrische Rindsleber (einige Stunden alt); sonst hielten wir die gleichen Versuchsbedingungen ein. Wir behandelten je einen Ansatz mit Sauerstoff und Kohlensäure und den Kontrollansatz ohne Crotonsäure mit CO_2 oder Luft. Bei unseren zahlreichen Versuchen wurden jeweils die nach Ansäuern der wässerigen Lösungen erhaltenen Ätherauszüge eingedampft und die optische Drehung der im Wasser aufgenommenen Rückstände im 1 dcm Rohr bestimmt. Wir erhielten für die Differenz der optischen Drehungen von Haupt- und Kontrollversuchen stets Werte von — 0,045 bis — 0,050 °. Diese Werte entsprechen vollkommen den von Friedmann erhaltenen Drehungen. Da sie aber innerhalb der Fehlergrenze des Polarimeters liegen, gestatten sie nicht, eindeutig auf das Entstehen von β-Oxybuttersäure zu schließen. Diese müßte vielmehr näher identifiziert werden. Daher versuchten wir eine Trennung der unveränderten, noch vorhandenen Crotonsäure von evtl. entstandener β-Oxybuttersäure durchzuführen. Nach mehrmaligem Digerieren mit Petroläther zur Entfernung der Crotonsäure, die zu 80 % des Ansatzes kristallisiert wiedergewonnen werden konnte, gelang es nicht, durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure, Crotonsäure auch nur in Spuren nachzuweisen. Wenn die optische Drehung auf β-Oxybuttersäure zurückzuführen wäre, hätten dabei 41 mg Crotonsäure gebildet werden müssen. In zwei anderen Versuchsreihen sollte die Trennung der beiden Säuren durch Verestern mit Diazomethan über die Methylester durchgeführt werden. Wie die Vakuumdestillation zeigte, war überhaupt kein β-Oxybuttersäuremethylester entstanden. Zwischen den Sauerstoff- und Kohlensäureversuchen ließ sich kein Unterschied feststellen. Da auf keine Weise das Entstehen von β-Oxybuttersäure nachzuweisen war, glauben wir, daß die geringe optische Drehung, die ja auch im Kontrollversuch vorhanden war, auf aus der Leber stammende optisch aktive Substanz zurückzuführen ist.

Es gelang uns somit nicht, in einer Reihe von Versuchen, die von Friedmann gemachte Beobachtung der Hydratisierung von Crotonsäure durch Hundeleberbrei mit Rindsleber zu bestätigen.

Unsere Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß α-β ungesättigte Säuren in Versuchen mit Hefe oder Leber weder durch Sauerstoffaufnahme noch durch Wasseranlagerung verändert werden.

b) Acetaldehydbildung aus Crotonsäure und β-Oxybuttersäure.

Kühnau[76]) war es gelungen, durch Einwirkung von Leberextrakt auf β-Oxybuttersäure Acetaldehydbildung festzustellen. Da wir eine biologische Hydratation der ungesättigten Säuren mit den bisher besprochenen Methoden nicht nachweisen konnten, eine weitere Möglichkeit des Abbaues der C_4-Körper aber in der Abspaltung von Acetaldehyd bestehen würde, prüften wir, ob sich analog den Kühnau'schen Befunden eine solche aus β-Oxybuttersäure und aus Crotonsäure feststellen ließe. Der Versuch zum Nachweis des Acetaldehyds wurde, wie bei Kühnau, mit Hilfe seiner Dimedonverbindung ausgeführt. Da diese Reaktion sehr empfindlich und charakteristisch ist, so konnte man hoffen, daß der Nachweis selbst dann gelingt, wenn intermediär aus Crotonsäure analytisch nicht mehr nachweisbare Mengen von β-Oxybuttersäure auftreten.

Außer den Versuchen mit Leberextrakt wie bei Kühnau führten wir Kontrollen mit m/15 sekundärer Phosphatlösung aus. In einer anderen Versuchsreihe wurde weniger als $^1/_{10}$ Mol Alanin, bezogen auf die Säure, zugesetzt, und auch für sich allein, bezüglich seiner Wirkung auf Crotonsäure, untersucht. Wir rechneten damit, daß Aminosäuren, deren katalytische Wirkung auf die Aldolkondensation bekannt ist, auch bei der Spaltung des Aldols, das von Kühnau als Zwischenprodukt angenommen wurde, eine wichtige Rolle spielen könnten.

Eine Acetaldehyd- oder Aldolbildung konnte weder in Versuchen mit β-Oxybuttersäure noch in denen mit Crotonsäure nachgewiesen werden. Eine Bestätigung der Kühnau'schen Befunde gelang uns somit nicht, und wir müssen auf Grund dieser Versuche die Spaltung der C_4-Körper in Acetaldehyd ausschließen.

c) Einwirkung von Hefe auf Acetaldehyd und Acetaldehyd-Kondensationsprodukte.

Haehn[93]) war es gelungen, mit der Hefe Endomyces vernalis aus Acetaldehyd Bildung von Fett nachzuweisen. Es wäre somit Acetaldehyd als Grundbaustein der Fette zu betrachten, die aus ihm durch Aldolkondensation über die C_4-Körper entstanden wären. Um zu prüfen, ob diese also nicht nur als Abbau-, sondern auch als Aufbauprodukte in Frage kommen, wurde das Verhalten von Acetaldehyd, Aldol und dem Acetaldehyd-Kondensationsprodukt nach Tollens[81]) unter der Einwirkung von Hefe untersucht und zwar daraufhin, ob die genannten Substanzen oxydativ angegriffen werden.

Für die Sauerstoffaufnahme von Acetaldehyd erhielten wir bereits nach 75' ein Molverhältnis von Acetaldehyd zu Sauerstoff wie 1:1,1. Für Aldol betrug die Sauerstoffaufnahme nur den zehnten Teil, für Aldolkondensationsprodukt die Hälfte. Diese Versuche bestätigen die bereits vorhandenen Ergebnisse, daß Acetaldehyd selbst von Hefe oxydativ angegriffen wird[88]). Hingegen finden unter ihrer Einwirkung wahrscheinlich keine Kondensationen statt, da Kondensationsprodukte oxydativ nur langsam angegriffen werden. Die direkte Oxydation von Acetaldehyd führt natürlich zu Essigsäure, deren weiteres Schicksal ausgedehnt untersucht ist[23], [24], [29], [49], [50], [51], [52], [53], [54], [55], [56]). Autoxydation des Acetaldehyds liegt nicht vor, wie eine Kontrolle beweist, die nur Acetaldehyd und Puffer enthielt und überhaupt keinen Sauerstoffverbrauch zeigte.

Nach unseren Versuchsergebnissen zu schließen, spielt Acetaldehyd weder beim Fettsäureaufbau noch beim -abbau eine entscheidende Rolle; beim Aufbau wohl deshalb nicht, weil sonst zu erwarten wäre, daß Aldehyd-Kondensationsprodukte oxydativ verändert werden könnten. Was die Abbaureaktionen anbetrifft, so sind diese Ergebnisse ein erneuter, wenn auch indirekter Beweis dafür, daß das Entstehen von Acetaldehyd aus C_4-Körpern auszuschließen ist, da sein Auftreten sich in unseren Versuchen unbedingt durch Sauerstoffaufnahme bemerkbar machen müßte.

C. Versuche mit β-Oxysäuren.

Von β-Oxysäuren wurde ausschließlich die β-Oxybuttersäure untersucht. Die Untersuchung der Sauerstoffaufnahme dieser Säure in Versuchsansätzen mit Hefe und mit Rindsleberschnitten ergab Werte, die in derselben Größenordnung lagen, wie für Hefe und Leberschnitte allein. Meist trat sogar eine gewisse Hemmung der Atmung ein. Diese Befunde stehen in völliger Übereinstimmung mit unseren entsprechenden Versuchen über Crotonsäure (S. 20). Das Ausbleiben der Reaktion kann nicht auf die bekannte Giftwirkung der β-Oxybuttersäure[82]) zurückgeführt werden, da wir in einer Verdünnung arbeiteten (Lösungen = $^1/_{60}$ molar), die nach den Literaturangaben[76]) nicht mehr vergiftend wirkt.

Es gelang uns also, für β-Oxybuttersäure ebenso wie für Crotonsäure nachzuweisen, daß sie von Leber und Hefe oxydativ nicht angegriffen werden.

D. Schicksal der Acetessigsäure.

Da die Acetessigsäure, wie in Abschnitt I,3 ausgeführt ist, in der Theorie zum Abbau der Fettsäuren als Intermediärprodukt im Organismus eine sehr wichtige Rolle spielt, prüften wir ihr Verhalten gegenüber Hefe und Leber. Es war festzustellen, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Abnahme der Säure erfolgt, infolge eines oxydativen Angriffes, einer Reaktion oder einer anderen Umsetzung.

Es wurde zunächst die Sauerstoffaufnahme bestimmt.

1. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme von Acetessigsäure unter der Einwirkung von Hefe oder Leber.

a) Einwirkung von Hefe.

Die für unsere Versuche verwendeten Lösungen von acetessigsaurem Na waren durch Verseifen von Acetessigester mit der aequivalenten Menge Lauge erhalten worden. Zur Entfernung des bei der Verseifung entstandenen Alkohols wurden die Lösungen bis auf ein Viertel des Volumens eingedampft und zur Beseitigung des noch unverseiften Esters nach genauer Neutralisation mehrmals ausgeäthert.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme unter der Einwirkung von Hefe ergab zunächst, daß die Versuchsansätze mit Hefe und Säure einen wesentlich größeren Sauerstoffverbrauch zeigten als die stets zur Kontrolle der Eigenatmung herangezogenen Ansätze mit Hefe und Puffer allein. Einzelne widersprechende Ergebnisse veranlaßten eine genauere Nachprüfung. Dabei ergab sich, daß ein länger fortgesetztes Einengen der Lösungen von acetessigsaurem Na bis auf ein Zehntel des Volumens (im Vakuum) eine Säurelösung ergab, die in Hefeversuchen kaum höhere Sauerstoffaufnahme zeigte als die Kontrollversuche. Die Sauerstoffaufnahme in den ersten Versuchen muß also auf in der Acetessigsäurelösung noch vorhandene Spuren nicht vollständig entfernten Alkohols zurückgeführt werden. Nachdem diese Fehlerquelle festgestellt worden war, gelang es uns zu zeigen, daß frische, unter allen Vorsichtsmaßregeln dargestellte Lösungen von acetessigsaurem Na mit Hefe zusammen keine Vermehrung der Sauerstoffaufnahme von atmender Hefe bewirken.

In weiteren Versuchen prüften wir nun, ob Acetessigsäure beim Abbau von Glukose durch Hefe oxydativ angegriffen wird. Unsere Ansätze mit Acetessigsäure, Glukose und Hefe zeigten einen geringen Sauerstoffmehrverbrauch gegenüber den Kontrollen mit Glukose und Hefe ohne Acetessigsäure. Das Molverhältnis Acetessigsäure zu mehrverbrauchtem Sauerstoff beträgt jedoch nach 90' 7:1 und ist erst nach 7 Stunden auf 1:1 gestiegen. Es ist dabei wichtig zu beachten, daß die Gesamtaufnahme an Sauerstoff über sieben mal so groß ist als der Betrag, der sich aus der Differenz für die Acetessigsäure allein ergibt. Die weiter unten beschriebene kolorimetrische Bestimmung der Acetessigsäure zeigt, daß auch unter diesen Bedingungen keine Abnahme erfolgte. Der gemessene Sauerstoffmehrverbrauch des Ansatzes mit Acetessigsäure hat demnach mit dem Abbau dieser Säuren nichts zu tun.

In unseren Versuchen wird Acetessigsäure weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Glukose (d. h. zusammen mit Glukoseabbau) durch Hefe oxydativ verändert.

b) Einwirkung von Leber.

Die Bestimmung der O_2-Aufnahme von Acetessigsäure unter Einwirkung von Leber führten wir zunächst mit Schnitten von Rindsleber aus. Sie führten zu den gleichen Ergebnissen wie die entsprechenden Hefeversuche. Es wurde im allgemeinen keine Sauerstoffaufnahme festgestellt, wenn reine Acetessigsäurelösungen zur Anwendung gelangten und die Eigenatmung des Gewebes berücksichtigt wurde; waren jedoch noch Spuren von Alkohol vorhanden, so konnte stets eine Sauerstoffmehraufnahme gegenüber den Kontrollen beobachtet werden.

Da die Rindsleber jedoch nicht ganz frisch, sondern zwei bis drei Stunden nach der Schlachtung für die Versuche verwandt wurde, mußten wir uns vergewissern, ob nicht während dieser Zeit die Aktivität des Gewebes geschädigt worden war. Wir gingen deshalb dazu über, Schnitte von Rattenleber sofort nach der Tötung der Tiere zu verwenden. Auch in diesen Versuchen konnten wir jedoch mit einwandfreien Acetessigsäurelösungen höchstens ganz minimale Sauerstoffaufnahme nach Abzug der Eigenatmung des Gewebes feststellen. Es nahm z. B. ein Ansatz mit 100 mg Leber-Trockengewicht und 0,1 Millimol Acetessigsäure im Verlauf von 90 Minuten $^1/_{200}$ Millimol Sauerstoff auf. Auch in allen anderen Versuchen war das Molverhältnis von angewandter Acetessigsäure zu aufgenommenem Sauerstoff nie höher als 20:1. In einer Reihe von Versuchen nahmen sogar die Ansätze mit Acetessigsäure weniger Sauerstoff auf als die Kontrollansätze zur Bestimmung der Eigenatmung. Acetessigsäurelösungen, die mehrere Tage alt waren

(oder noch Alkohol enthielten), zeigten wie bei den Hefeversuchen etwas höhere Sauerstoffaufnahme, die jedoch durch Zersetzungsprodukte hervorgerufen war.

2. Dekarboxylierung der Acetessigsäure.

Es wäre nun möglich, daß Acetessigsäure durch Hefe oder Leber verbraucht wird, ohne daß ihr Umsatz in einem Mehrverbrauch an Sauerstoff in Erscheinung tritt.

Es sollte zunächst die Möglichkeit ihrer Dekarboxylierung untersucht werden. Pollak[46]) hatte bereits gezeigt, daß Lösungen von acetessigsaurem Na mit Eiweiß, Pepton und Aminosäurelösungen, in molarem Verhältnis versetzt, dekarboxyliert werden. St. Weiß[97]) und darauf Ljunggren[98]) wiesen nach, daß diese Dekarboxylierung der Acetessigsäure durch Aminosäuren katalysiert wird.

Nachdem wir in unseren Versuchen mit Hefe oder Leber keine Kohlensäureabspaltung aus Acetessigsäure hatten feststellen können, untersuchten wir den Einfluß von Prolin und Alanin. Wir stellten fest, daß bereits bei einem Molverhältnis Acetessigsäure zu Alanin, das noch nahe bei 1:1 lag, nach 3 Stunden 1,5 % und nach 17 Stunden erst 7 % der Acetessigsäure dekarboxyliert waren. Eine Änderung des Molverhältnisses von Acetessigsäure zu Alanin = 3:1 ergab die gleichen Werte. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund von St. Weiß überein, daß Alanin auf Acetessigsäure keinen dekarboxylierenden Einfluß ausübt[97]).

Prolin erwies sich als genau doppelt so wirksam wie Alanin. Aber auch hier sind die Umsätze in großen Zeiträumen noch so gering, daß für unsere Versuche eine Dekarboxylierung der Acetessigsäure durch diese Aminosäuren als Katalysatoren nicht in Frage kommt.

Fände Dekarboxylierung statt, so müßte Aceton entstehen; dieses wird aber, wie wir experimentell bestätigen konnten, von Hefe nicht angegriffen. Dieser Befund kann als erneute Bestätigung dafür dienen, daß Dekarboxylierung auszuschließen ist.

3. Quantitative Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure.

Um nun festzustellen, ob die Acetessigsäure von Hefe oder Leber ohne Sauerstoffbeteiligung verbraucht wird, gingen wir dazu über, die Säure selbst am Anfang und am Ende gleichartiger Versuche, wie sie zur manometrischen Messung der Sauerstoffaufnahme gedient hatten, quantitativ zu bestimmen.

I. Bestimmung nach der Methode von Huppert-Messinger.

Wir benutzten zunächst die Methode von Huppert-Messinger, bei der die Acetessigsäure durch Destillation mit verdünnter Säure in Aceton übergeführt, und dieses in der Vorlage jodometrisch bestimmt wird. In zwei Versuchen, die 5 bezw. 6 Stunden mit Hefe unter Sauerstoff geschüttelt wurden, fanden wir statt einer Abnahme eine Zunahme um 7 % bezw. 23 %, die offenbar auf Produkte aus der Hefe zurückzuführen ist. In einem Versuch, der 8 Stunden unter Sauerstoff geschüttelt, dann aber über Nacht noch im Thermostaten belassen wurde, war jedoch fast alle nach dieser Methode mit Jod titrierbare Substanz verschwunden. Bei der geringen Sauerstoffkonzentration in der ruhig stehenden Lösung muß das Ergebnis wohl durch die von Friedmann[78]) bereits festgestellte Reduktion zu β-Oxybuttersäure gedeutet werden.

II. Kolorimetrische Bestimmung der Acetessigsäure mit Ferrichlorid.

a) Ausarbeiten der Methode.

Da die Methode nach Huppert-Messinger für Reihenversuche zu zeitraubend gewesen wäre, selbst wenn es gelungen wäre, den Einfluß der aus Hefe stammenden, Jod verbrauchenden Substanz auszuschalten, so bauten wir die Ferrichloridreaktion für unseren Zweck als kolorimetrische Bestimmungsmethode der Acetessigsäure aus. Dabei ergab sich die Notwendigkeit, um größere Fehler zu vermeiden, die zugegebene Menge Ferrichlorid der vorhandenen Menge Acetessigsäure anzupassen, weil die Eigenfarbe des Ferrichlorids in der neutralen Lösung durch Änderung des Farbtones beim kolorimetrischen Vergleich der Farbintensität beträchtlich stört. Bei einem molaren Verhältnis von Acetessigsäure zu Ferrichlorid = 1:1,8 erhielten wir einen Fehler von — 2 %, bei einem Überschuß von ⅓ Mol $Fe\,Cl_3$ betrug er — 5,5 %, während bei dem molaren Verhältnis 1:1 15,5 % zu wenig gefunden wurden. Bei Anwendung eines jeweiligen Überschusses von ein Drittel Mol Eisenchlorid pro Mol Acetessigsäure erhielten wir für den Vergleich verschieden konzentrierter Lösungen von 1:1 bis 1:2 einen maximalen Fehler von — 0,8 %, der in der Fehlergrenze des Kolorimeters liegt. Beim Verhältnis der Konzentrationen 5:1 betrug der Fehler jedoch — 15 %.

Darauf untersuchten wir den Einfluß von Phosphat, da dieses in unseren Versuchsansätzen immer vorhanden war.

Wie zu erwarten, entstanden beim Zusatz von Ferrichlorid zu Acetessigsäurelösungen, die gleichzeitig Phosphat enthielten, kolloidale Niederschläge von Eisenphosphat. Durch Zusatz von Alkohol gelang es, filtrierbare Lösungen zu erhalten. Wir erzielten die besten Ergebnisse mit 0,1 m alkoholischer Ferrichloridlösung und zwar in einem Verhältnis von Acetessigsäure zu Ferrichlorid = 1:1,6 und kolorimetrierten in mindestens 60 %igem Alkohol. Die Bestimmung der Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0,004 m und 0,016 m ergab dabei Fehler von — 0,7 bis — 1,7 %. Beim Vergleich stärker molarer Lösungen (0,02 bis 0,06) wuchs der Fehler bis zu — 4 %. Da wir in unseren Versuchen die Lösungen zum Kolorimetrieren so weit verdünnten, daß diese höchstens 0,016 molar waren, kam meistens die erste Konzentration in Betracht; wir können also durchschnittlich mit ± 1,5 % Genauigkeit unserer Ergebnisse rechnen. Dies entspricht z. B. bei einer 0,286 molaren Versuchslösung 3 mg und bei 0,017 molarer Versuchslösung 0,15 mg.

b) Bestimmung der Adsorption an Hefe oder Lebergewebe.

In den ersten Versuchen, die nach der kolorimetrischen Methode ausgewertet wurden, und die wie die früheren keine Sauerstoffaufnahme zeigten, stellten wir eine beträchtliche Abnahme der Acetessigsäure fest. Da Reduktion der Acetessigsäure beim Schütteln unter Luft unwahrscheinlich ist, prüften wir, ob der Verbrauch durch Adsorption hervorgerufen wird. Schon nach sekundenlangem Durchschütteln der Hefe- oder Lebersuspensionen mit der Acetessigsäurelösung und sofortigem Abzentrifugieren waren in Hefeversuchen bis zu 13 %, in Rattenleberversuchen bis zu 30 % (berechnet auf 100 mg Lebertrockengewicht) Säure verschwunden. Es mußten daher zu jedem Versuch Kontrollbestimmungen durchgeführt werden, da sich die Adsorption je nach der Konzentration der Lösungen und der Beschaffenheit der Leber oder Hefe änderte.

Für je 5 ccm Hefesuspension (entspr. 0,5 g Hefe) lag die Adsorption bei 0,016 bis 0,22 molaren Versuchslösungen in den Grenzen zwischen 0,7 und 12 %; in absoluten Mengen ausgedrückt wurden 0,5 bis 10,9 mg Säure adsorbiert. Einige Versuche zeigten eine scheinbare Zunahme der Säure um 1 %. Dieser Wert liegt in der Fehlergrenze der Methode.

Für je 1 g Rindsleberschnitte erhielten wir für 0,057 bis 0,29 molare Lösungen Adsorptionswerte von 4,2 bis 13,7 %, die 4,3 bis 12,2 mg adsorbierter Säure entsprechen.

In Versuchen mit Rattenleberschnitten wurden aus 0,03 bis 0,1 molaren Lösungen 0,7 bis 23,5 % Acetessigsäure adsorbiert, entsprechend 0,1 bis 7 mg Acetessigsäure. Auf 100 mg

Lebertrockengewicht umgerechnet, steigt die Abnahme im Höchstfall für 0,66 molare Lösungen auf 35,7 % = 7,4 mg Säure. In den Tabellen sind die Versuche nach fallender Molarität angeordnet. Von einigen Schwankungen abgesehen, ergibt sich dabei das Bild, daß die adsorbierte Menge Acetessigsäure ungefähr mit der Konzentration derselben in der Lösung fällt. Eine strenge Proportionalität zwischen der Molarität der Lösungen und der adsorbierten Acetessigsäuremenge läßt sich aber nicht feststellen, da einige Werte vollkommen herausfallen.

c) Kolorimetrische Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure durch längere Einwirkung von Hefe oder Leber.

1. Versuche mit Hefe.

Die meisten Versuche ergaben eine Abnahme, die auch nach Abzug der Werte der dazugehörigen Adsorptionsversuche zunächst noch sehr beträchtlich blieb. Entscheidend sind jedoch hier die Versuche mit toter Hefe, die in gleichen Zeiten in allen daraufhin untersuchten Fällen eine mindestens ebenso große oder sogar größere Abnahme von Acetessigsäure aufwiesen. Dazu war in einigen Versuchen die kolorimetrisch gefundene Abnahme nach längerer Zeit kleiner als nach kürzerer Zeit. Es darf demnach aus der in einigen Versuchen gefundenen scheinbaren Abnahme nicht auf einen fermentativen Verbrauch von Acetessigsäure geschlossen werden.

2. Versuche mit Rindsleber.

Bei den Versuchen mit Rindsleber finden wir ähnliche Verhältnisse wie bei denjenigen mit Hefe. Die Abnahme der Acetessigsäure in den Schnellversuchen reicht in einigen Fällen nicht an die Abnahme in den Versuchen über längere Zeit heran. Das gekochte Gewebe ergibt jedoch eine ebenso große, häufig noch eine größere Abnahme. Es ist damit festgestellt, daß Acetessigsäure auch von Rindsleber weder fermentativ oxydiert noch gespalten wird.

3. Versuche mit Rattenleberschnitten.

In diesen Versuchen stellten wir zunächst Abnahmen der Acetessigsäure aus 0,033 bis 0,1 molaren Lösungen bis zu maximal 32,6 %, durchschnittlich rund 17 %, fest. Wir erhielten jedoch auch in den Schnellversuchen Werte, die in derselben Größenordnung lagen. Außerdem stellten wir fest, daß die Ab-

nahme nach 15 Minuten schon genau ebenso groß war wie diejenige nach 30 Minuten und 1½ Stunden; aus 0,1 m Lösungen waren in dieser Zeit rund 10 bis 12 % verschwunden. Es handelt sich also vermutlich um einen Adsorptionseffekt, den wir mit den Schnellversuchen nur deshalb nicht quantitativ erfassen konnten, weil die Adsorption nicht momentan verläuft, und wir haben es auch in diesem Falle nicht mit einer fermentativen Veränderung der Acetessigsäure unter der Einwirkung von Rattenleber zu tun.

d) Ergebnisse der Versuche mit Acetessigsäure.

Unsere Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß Acetessigsäure weder durch gärende Hefe noch durch Lebergewebe, das noch kräftig Glykogen veratmet, unter den von uns gewählten Bedingungen verändert wird. Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen anderer Forscher[77, 78, 96]), die Veränderungen der Acetessigsäure mit Hefe oder Leber nachweisen konnten. Unter anderen Versuchsbedingungen war weder die des öfteren festgestellte Reduktion zu β-Oxybuttersäure noch eine Abnahme bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose zu beobachten[78]). Die Annahme Henzes[57]), daß Acetessigsäure mit den Zwischenprodukten des Zuckerabbaues reagiert, konnte somit nicht bestätigt werden. Ein schneller Abbau der Acetessigsäure[46, 97]) durch Dekarboxylierung ist nicht nachgewiesen worden, ebensowenig die Spaltung zu zwei Molekülen Essigsäure, deren Auftreten sich auch durch Sauerstoffverbrauch hätte bemerkbar machen müssen. Als eine Erklärung bleibt, daß die beobachtete Abnahme der Acetessigsäure nur auf einer Adsorption an Hefe oder Lebergewebe beruht.

E. Versuche mit höheren β-Ketosäuren.

1. Darstellung der β-Ketosäuren.

Das physiologische Verhalten der höheren β-Ketosäuren wurde bisher noch nicht näher untersucht. Diese wurden zunächst von uns synthetisiert, und ihr Verhalten gegenüber Hefe geprüft.

Als Beispiel wurden die β-Ketomyristin- und β-Ketostearinsäure bezüglich ihrer Sauerstoffaufnahme und die erste hinsichtlich ihrer Abnahme unter der Einwirkung von Hefe unter-

sucht. Die β-Ketosäureester wurden nach der für Butyrylessigester[87]) beschriebenen Methode aus Na-Acetessigester und der äquivalenten Menge Laurinyl- bezw. Palmitylchlorid dargestellt. Nach Verseifen des β-Ketomyristinsäureesters wurde eine Säure vom Schmp. 76—78 ° erhalten, die entgegen den Angaben in der Literatur[63]) (Schmp. 39—40 °) nach den Analysenergebnissen die gesuchte Ketosäure sein muß. Sie besitzt die Eigenschaft, leicht dekarboxyliert zu werden und gibt mit Ferrichlorid Rot-Färbung. Indessen zeigt das aus den Mutterlaugen erhaltene Produkt den in der Literatur für die Ketosäure angegebenen Schmp. 38—39 °. Wir halten es für das entsprechende Methylketon. Es ist in Lauge unlöslich und gibt mit Ferrichlorid keine Rot-Färbung.

2. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.

In den Versuchen zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme wirkten β-ketomyristinsaures Na und β-ketostearinsaures Na auf Hefe so stark hemmend, daß jede Eigenatmung sofort vollkommen aufhörte. Die Hefe wurde also nicht wie in den früheren Versuchen mit Fett- oder Acetessigsäure usw. nur teilweise abgetötet, während der überlebende Anteil auf Kosten des toten Anteiles lebhafter atmete, sondern es muß bereits in den ersten Minuten Vergiftung der Hefe durch diese Ketosäuren eingetreten sein.

3. Quantitative Bestimmung der Abnahme der β-Ketomyristinsäure.

Für die Bestimmung der β-Ketomyristinsäure nach der für Acetessigsäure ausgearbeiteten Methode mit Ferrichlorid war es wichtig, darauf zu achten, daß sämtliche Verdünnungen der Versuchslösungen mit absolutem Alkohol vorgenommen wurden, da die Methode sonst ungenaue Werte liefert.

Der scheinbare Verbrauch der β-Ketosäure durch Hefe (bis zu 72 % maximal), der sich aus den Ergebnissen unserer kolorimetrischen Versuche ergab, könnte wie bei Acetessigsäure auf Adsorption beruhen; denn die Werte für die Versuche mit lebender und solche mit gekochter Hefe decken sich fast vollständig.

Eine fermentative Veränderung der β-Ketomyristinsäure durch Hefe konnte demnach von uns nicht festgestellt werden.

F. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

a) In Atmungsversuchen nach Warburg stellten wir fest, daß normale Fettsäuren und die für ihren physiologischen Abbau in Betracht gezogenen Zwischenprodukte: α-β ungesättigte, β-Oxy-, β-Ketosäuren und insbesondere auch die Acetessigsäure unter der Einwirkung von Hefe oder Leber keine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs hervorrufen. Die einzige Ausnahme bilden Essigsäure und Acetaldehyd, die unter unseren Bedingungen lebhaft Sauerstoff aufnehmen.

b) Die Versuche zur Lösung der Frage nach einer Veränderung der theoretischen Zwischenprodukte durch Hefe oder Leber ohne Beteiligung von Sauerstoff ergaben folgende Resultate:

1. Hydratation von α-β ungesättigten Säuren konnte weder unter Sauerstoff noch unter Stickstoff festgestellt werden, auch nicht in Hefeversuchen, denen Glukose zugesetzt wurde.
2. Die Prüfung des Abbaues von Croton- und β-Oxybuttersäure durch Acetaldehydabspaltung in Phosphatlösung oder Leberextrakt, mit oder ohne Alaninzusatz, verlief negativ.
3. Bei der Untersuchung des Acetaldehyds und seiner Kondensationsprodukte bezüglich ihrer Rolle als Abbau- oder als Aufbauprodukt bei der Fettsäureverbrennung stellten wir fest, daß Acetaldehyd selbst von Hefe oxydativ angegriffen wird, daß aber Aldol und das Kondensationsprodukt nach Tollens nur sehr geringen Sauerstoffverbrauch aufweisen.
4. Zur Frage der Veränderung der Acetessigsäure sowie höherer β-Ketosäuren auf einem anderen Weg als auf dem des oxydativen Abbaues wurde die Eisenchloridreaktion zu einer kolorimetrischen Methode ausgearbeitet, da sich die bekannten Methoden zur Bestimmung der Abnahme von β-Ketosäuren als ungeeignet für Reihenversuche erwiesen. Wir erreichten eine Fehlergrenze von $\pm$ 2 %.
5. Mit Hilfe dieses Verfahrens beobachteten wir eine geringe Abnahme von Acetessigsäure und von β-Ketomyristinsäure, konnten jedoch beweisen, daß diese nicht auf einer fermentativen Veränderung, wahrscheinlich aber auf Adsorption an Hefe oder Lebergewebe beruht.
6. Dekarboxylierung der Acetessigsäure durch Aminosäuren (Alanin und Prolin) als Katalysatoren war nicht festzustellen.

V. Experimenteller Teil.

1. Methodisches zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahmen.

Die manometrischen Messungen in den Versuchen zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme wurden im Barcroft-Warburg-Schüttelthermostaten durchgeführt[80]). Die verwendeten Atmungströge enthielten Einsatzgefäße für Kalilauge zur Bindung der bei Atmungsversuchen entwickelten Kohlensäure. Ein kleines drehbares Ansatzgefäß erlaubte es, ohne die Versuche zu unterbrechen, zu einem beliebigen Zeitpunkt z. B. Säure zu den Versuchsansätzen zuzugeben. Die Verwendung eines der Gefäße als Thermobarometergefäß machte die Messungen auch von kleinen Temperaturschwankungen unabhängig. Die Meßgenauigkeit beträgt wenige cmm.

Die Schüttelgefäße wurden immer sofort nach dem Einpipettieren der Lösungen in den Thermostaten gebracht. Bis zur Erreichung des Temperaturausgleiches wurde bei den Atmungsversuchen 7—12 Minuten bei offenen Manometerhähnen geschüttelt. Bei den unter Stickstoff durchgeführten Versuchen blieben die Hähne geschlossen; der beim Einbringen der Gefäße in den Thermostaten entstandene Überdruck wurde von Zeit zu Zeit durch rasches Öffnen und Schließen der Hähne abgelassen.

Die Werte für Sauerstoffaufnahme oder Gasentwicklung wurden nach je 10 Minuten durchschnittlich abgelesen. Aus der Reihe der Ablesungen sind in den Tabellen immer nur einzelne Werte angegeben. Wenn die Sauerstoffaufnahmen während der ganzen Dauer des Versuches im gleichen Verhältnis der Endwerte waren, haben wir nur diese gebracht. Die aufgenommene oder entwickelte Gasmenge ist in ccm angegeben. Es liefen meist bei jedem Versuch zwei, oft sogar drei, vollkommen gleiche Ansätze und dementsprechend ebensoviele Kontrollen. Wenn sich die ermittelten Werte deckten, wurde nur der Wert eines Ansatzes angeführt, bei nahe zusammen liegenden Werten wurde das Mittel angegeben.

2. Bereitung von verarmter Hefe[88]).

Wir verwendeten untergärige Hefe, die jedoch eine von Fall zu Fall verschiedene Anzahl von Gärungen hinter sich hatte, da wir nicht immer frisches Material bekommen konnten. Die zeitweise unregelmäßigen Resultate unserer Versuche unter

sonst gleichen Bedingungen könnten vielleicht durch diese Unterschiede erklärt werden.

Die von der Ganter-Brauerei Freiburg zur Verfügung gestellte Hefe wurde 3 bis 4 mal mit frischem Wasser gewaschen und abgenutscht. 16 g davon wurden jeweils in 140 ccm 0,1 molarer, mit Toluol gesättigter Phosphatpufferlösung vom $p_H = 6$ 18 bis 22 Stunden im Thermostaten bei 30° geschüttelt. Die nach dieser Zeit noch vorhandene Eigenatmung der Hefe wird bei den jeweiligen Versuchen berücksichtigt werden. Die Suspension wurde höchstens noch einen Tag nach dem Verarmen verwendet, da zu späterer Zeit Schädigung durch Autolyse und Bakterien zu befürchten ist. Bei den Versuchen, bei denen die Sauerstoffaufnahme gemessen wurde, befanden sich stets 0,3 ccm 40 %ige KOH in den Einsatzgefäßen.

Sämtliche Versuche mit Hefe wurden bei 30° durchgeführt.

Die als Substrat zur Anwendung gelangenden Säuren wurden immer als wässerige Lösungen ihrer Alkalisalze zugefügt, auch dann, wenn zur Abkürzung nur die Säure selbst angegeben wurde.

Die Zubereitung von Leberbrei, -saft und Suspensionen von Leberschnitten wird bei den einzelnen Versuchen besprochen werden.

3. Versuche.

A. Beeinflussung der Atmung von Hefe durch tote Zellen.

Um feststellen zu können, ob bei unseren Versuchen eine Sauerstoffmehraufnahme der Hauptversuche gegenüber den Kontrollen auf die zugefügte Säure selbst zurückzuführen ist oder auf eine teilweise Schädigung der Hefe, die dann assimilierbare Substanz an die Lösung abgibt und auf diese Weise eine erhöhte Sauerstoffaufnahme hervorrufen könnte, gaben wir zu frisch verarmten Hefesuspensionen den dritten Teil gekochter Suspension.

Ansätze:
1. 5 ccm frische Hefesuspension, 2 ccm Phosphatpufferlösung p_H 6.
2. 5 ccm frische Hefesuspension, 2 ccm gekochte Hefesuspension.

Sauerstoffaufnahme in ccm:	1	2
nach 40'	0,22	0,38
„ 80'	0,43	0,78
„ 140'	0,67	1,42.

In 140 Minuten wurde die Sauerstoffaufnahme der Hefe durch Zusatz toten Gewebes auf rund das Doppelte gesteigert.

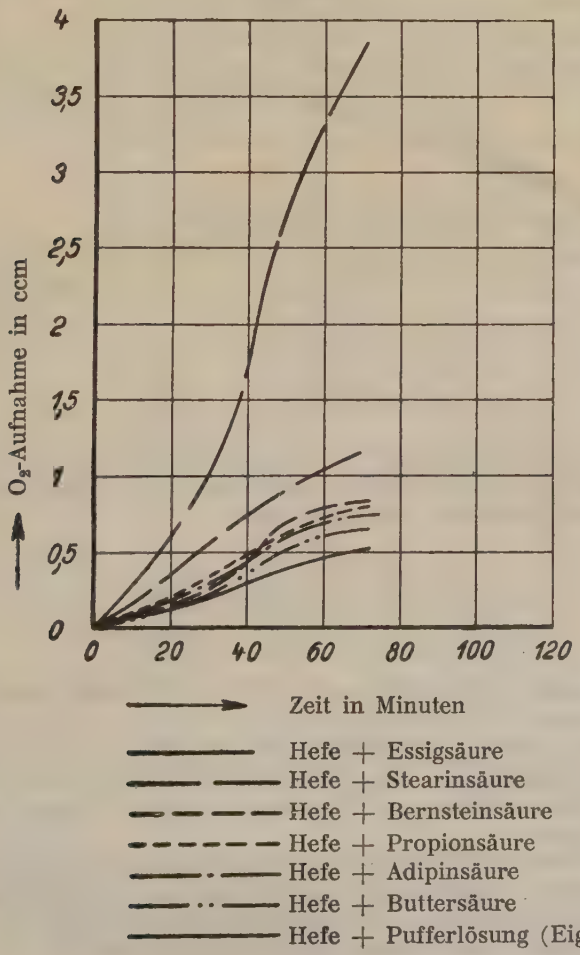
B. Versuche mit normalen Fettsäuren.

1. Einwirkung von Hefe.

Für die einzelnen Versuchsansätze wurden je 5 ccm Hefesuspension verwendet, zu der je 1 ccm einer 0,1 molaren Lösung eines fettsauren Salzes gegeben wurde, sodaß wir, auf das Endvolumen bezogen, mit 0,016 molaren Lösungen der Fettsäuren arbeiteten. In den Kontrollen wurde statt der Fettsäurelösung 1 ccm m/15 Phosphatpufferlösung p_H 6 zugegeben.

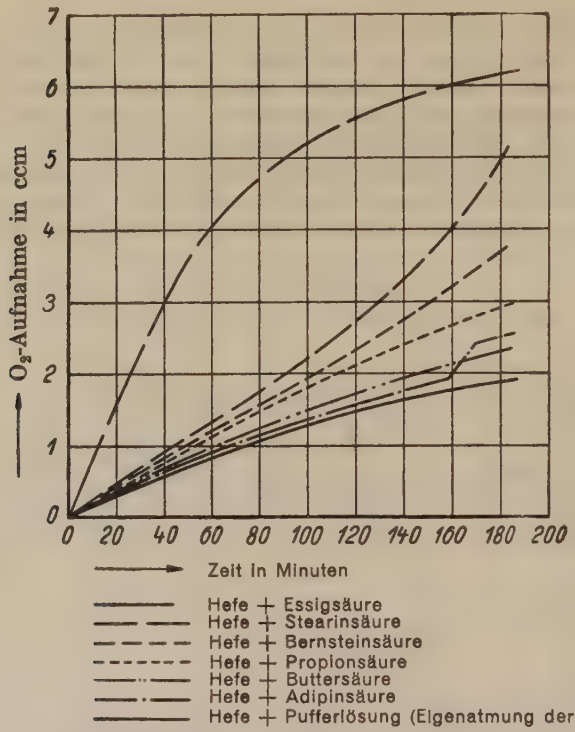
Wir untersuchten Essig-, Propion-, Butter-, Stearin- und als Beispiel von Dikarbonsäuren Bernstein- und Adipinsäure.

Versuch 1.



Versuch 2.

Wiederholung von 1 unter vollständig gleichen Bedingungen mit derselben Hefesuspension 24 Stunden später.



Die Sauerstoffaufnahme der Essigsäure beträgt nach einem weiteren Versuch ebenfalls nach 40 Minuten rund das Vierfache der Sauerstoffaufnahme von Hefe allein.

2. Einwirkung von Leber.

Bereitung der Leberpräparate.

Kalbs- und Rindsleber wurden 2 bis 3 Stunden nach Entnahme aus dem Tier verwendet.

a) Leberbrei: Rindsleber wurde durch die Fleischmaschine getrieben und mit der doppelten Menge m/15 Phosphatpufferlösung vom p_H 7,5 versetzt unter Zusatz einiger Tropfen Toluol.

b) Lebersaft: Der wie unter a) beschriebene, frisch bereitete Leberbrei wurde 1 bis 30 Stunden im Thermostaten bei 30° unter kräftigem Sauerstoffdurchleiten geschüttelt. Die Lösungen wurden darauf durch Zentrifugation geklärt.

c) Je 1 g oder 2 g von mm-dünnen Schnitten von Kalbsleber wurden in 5 ccm Phosphatpufferlösung p_H 7,5 für je einen Versuch verwendet.

d) Schnitte von Rattenleber[91, 99]: Die Leber von Ratten wurde 5 Minuten nach Töten der Tiere in auf 37° vorgewärmte Phosphat-Ringerlösung nach Krebs[84, 85]) gebracht. Mit dem Rasiermesser wurden sehr dünne Schnitte hergestellt, von denen 1 g in 4 ccm Phosphat-Ringerlösung für die Versuchsansätze verwendet wurde. Nach Beendigung der Versuche wurde das Trockengewicht durch einstündiges Erhitzen der Schnitte im Trockenschrank bei 100° bestimmt. Die Trockengewichte schwankten von 40 bis 90 mg. Der Durchschnittswert liegt bei 70 mg. Die Sauerstoffaufnahmen wurden auf 100 mg Trockengewicht umgerechnet.

Wir bestimmten die Sauerstoffaufnahmen der neutralen Lösungen von Stearin-, Palmitin-, Öl- und Essigsäure. 2 ccm 0,02 molarer Lösung von fettsaurem Salz wurden zu 2 bis 5 ccm Lebersuspension (Brei, Saft oder Schnitten) gegeben und in den Thermostaten gebracht.

Versuche mit Rindsleber.

In den Einsatzgefäßen befanden sich je 0,3 ccm 40%ige KOH. Mit wenigen Ausnahmen wurden die Versuche bei 30° ausgeführt.

Vers.	Leber	Molarität der Ansätze	Dauer des O_2-Durchleitens	Zeit	Eigenatmung	Palmitinsäure	Stearinsäure	Oelsäure
					Sauerstoffaufnahme in ccm			
1	3 ccm Brei	0,008	kein O_2	100'	0,50	0,42	0,42	0,29
1a	5 ccm Brei	0,0057	1 St.	90'	0,10	0,09	0,11	0,08
				135'	0,13	0,12	0,15	0,10
2	3 ccm Brei	0,008	kein O_2	85'	0,61	0,64	0,81	0,54
3	2 ccm Saft	0,01	1½ St.	75'	0,36	0,38	0,41	0,42
4	3 ccm Saft	0,008	1½ St.	55'	0,12	0,08	0,08	—
5	3 ccm Saft	0,008	1½ St.	90'	0,31	0,14	0,13	—
6	3 ccm Saft	0,008	2 St.	85'	0,09	0,07	0,10	—
				105'	0,10	0,08	0,12	—
6a	3 ccm Saft	0,008	4 St.	145'	0,08	0,07	0,08	—
				205'	0,21	0,16	0,17	—
7	5 ccm Saft	0,0057	30 St.	85'	0,38	—	0,30	—
8	5 ccm Saft	0,0057	30 St.	85'	0,36	—	0,28	—
9	1 g Schnitte	0,0057	kein O_2	90'	0,31	0,37	0,35	0,34
				155'	0,47	0,58	0,55	0,56
10	1 g Schnitte (derb)	0,0057	kein O_2	70'	0,34	0,21	—	—
10a	1 g Schnitte (fein)	0,0057	kein O_2	70'	0,29	0,28	—	—
11	2 g Schnitte	0,0057	kein O_2	40'	0,44	0,45	0,45	0,51
12	1 g Schnitte	0,0057	kein O_2	40'	0,35	0,23	0,35	—
				100'	0,70	0,48	0,68	—

Am Ende der Versuchszeit war bei 1 und 2 geringe p_H-Verschiebung ins Saure eingetreten (p_H 6,8—7).

Zu den Versuchen mit Rindsleber.

Für die Versuche mit Brei ist die Sauerstoffaufnahme in den Ansätzen mit Palmitin- oder Stearinsäure ebenso groß wie in den Kontrollen zur Bestimmung der Eigenatmung mit Ausnahme von Versuch 2. Hier übertrifft der Sauerstoffverbrauch des Stearinsäureansatzes denjenigen der Eigenatmung um ein Drittel.

In den Versuchen mit Saft ist die Sauerstoffaufnahme entweder gleich groß wie diejenige der Kontrolle oder bleibt sogar um ein Viertel bis ein Halb (Versuch 5) hinter ihr zurück. Mit wenigen Ausnahmen ergeben sich für Stearin- und Palmitinsäure die gleichen Sauerstoffwerte. Ein Unterschied in den einzelnen Versuchen, der sich auf verschieden lange Dauer des Sauerstoffdurchleitens zurückführen ließe, konnte nicht festgestellt werden.

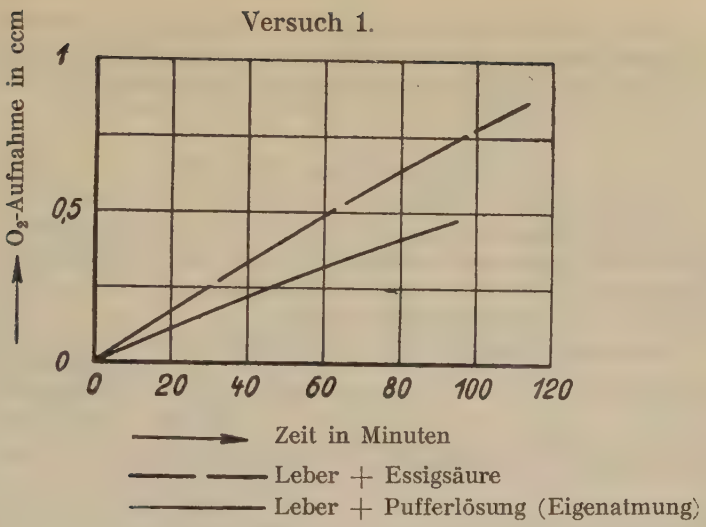
Die schwankenden Ergebnisse in den Versuchen mit Schnitten sind auf nicht gleichmäßige Schnittdicken zurückzuführen. Ausgenommen Versuch 9 mit um ein Viertel größerem Sauerstoffverbrauch gegenüber dem Kontrollansatz, erhielten wir für Eigenatmung und Versuchsansätze gleiche Sauerstoffwerte.

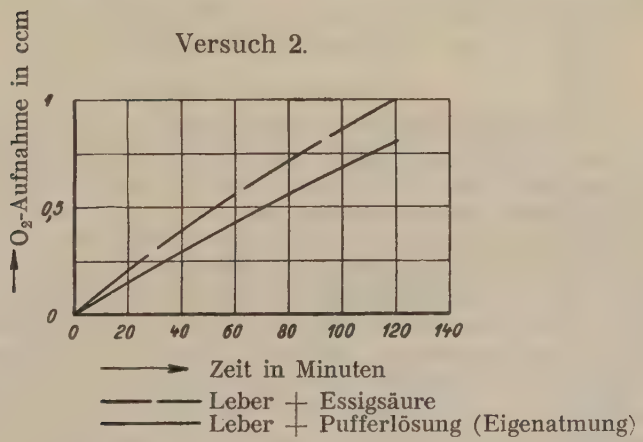
Die zum Vergleich herangezogene Ölsäure nimmt in den Versuchen mit Saft oder Schnitten rund ein Sechstel mehr Sauerstoff auf als die Kontrolle, während sie sich in den Leberbreiversuchen nicht von den gesättigten Säuren unterscheidet.

Einwirkung von Rattenleberschnitten auf Essigsäure.

Wir verwendeten zu jedem Versuch 3 ccm 0,03 molarer Essigsäure, sodaß wir jedes Mal die Sauerstoffaufnahme von 0,0001 Mol Essigsäure bestimmten.

Die Versuchstemperatur betrug 37°.





C. Versuche mit α-β ungesättigten Säuren.

a) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.

1. Einwirkung von Hefe.

5 ccm einer 0,1 molaren, mit NaOH neutralisierten Crotonsäurelösung wurden zu 5 ccm Hefesuspension (0,5 g Hefe) gegeben. (Ansätze 0,05 m.) Der Kontrollansatz zur Bestimmung der Eigenatmung der Hefe enthielt 5 ccm Phosphatpufferlösung p_H 6, anstelle der Säurelösung. Die Sauerstoffmehraufnahme des Ansatzes mit Crotonsäure betrug nach 10 Minuten 0,04 ccm und war auch nach 40 Minuten nicht höher gestiegen.

Zwei weitere unter denselben Bedingungen durchgeführte Versuche zeigten dasselbe Ergebnis, während in einem vierten Versuch die Sauerstoffaufnahme des Ansatzes mit Crotonsäure hinter der Eigenatmung der Hefe zurückblieb.

2. Einwirkung von Leber.

2 ccm einer 0,5 molaren Lösung von crotonsaurem Na wurden zu 1 g Rindsleberschnitten in 5 ccm m/15 sekundärer Phosphatlösung gegeben (Ansätze 0,14 m). Die Kontrollansätze zur Bestimmung der Atmung des Gewebes enthielten 1 g Leberschnitte in 7 ccm Phosphatlösung.

Sauerstoffaufnahme nach 35 Minuten:

Eigenatmung der Leber	Crotonsäure + Leber		Differenz ber. für Crotonsäure allein	
	1.	2.	1.	2.
0,42	0,48	0,61	0,06	0,19.

Molverhältnis von Crotonsäure zu aufgenommenem O_2 = 125 : 1.

b) Präparative Versuche zur Wasseranlagerung an α-β ungesättigte Säuren.

1. Einwirkung von Hefe.

Die präparativen Versuche wurden mit gewöhnlicher, nicht verarmter Brauerei-Hefe (aus der Löwenbrauerei Freiburg) ausgeführt. Die Hefe wurde mehrmals gewaschen, bis der Biergeruch verschwunden war und auf der Nutsche zur Trockne abgesaugt. 25 bis 35 g dieser Hefe ließen wir einwirken auf 50 bis 100 ccm der isotonischen (0,16 n) Lösungen von zimt-, croton- und fumarsaurem Na (erhalten durch Neutralisation der Säurelösungen mit NaOH gegen Phenolphtalein). Nach mehrstündigem Schütteln dieser Versuchsansätze unter Sauerstoff, Stickstoff oder im Vakuum bei 30° wurde kurz aufgekocht, zentrifugiert und die klaren Lösungen gewöhnlich auf 300 ccm, in Versuch 3 und 4 nur auf 200 ccm mit Wasser aufgefüllt. Im 1 dm-Rohr wurde die optische Drehung bestimmt. Als Kontrollen dienten einerseits Ansätze von Hefe mit isotonischer Kochsalzlösung, andererseits wurde zu den isotonischen Salzlösungen die gleiche Menge gekochter Hefe gegeben. Die Kontrollen wurden wie die Versuchslösungen behandelt und aufgearbeitet.

Nach Messen der optischen Drehung wurden in vier Versuchen die wässerigen Lösungen mit Phosphorsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt, 15 bis 24 Stunden im Kutscher-Steudel mit Äther extrahiert und die optische Drehung der Ätherextrakte bestimmt. Nach Abdampfen des Äthers zurückbleibende Substanz wurde abgewogen und identifiziert.

Die Versuchsergebnisse wurden in der folgenden Tabelle zusammengestellt (S. 43).

Versuch	ccm Säurelösung	Hefe in g	Versuchs-Zeit in Std.	Gasraum	opt. Drehung der wäss. Lösung	berechnet für β-Oxysäure in g	theor. mögl. Menge in g	Dauer der Aetherextr. in Std.	Opt. Drehg. der äth. Lös.	Aetherrückstand in g Angabe des Schmp.	% der Einwage
1a	200 Zimts.	35 fr.	5,5	Vak.	—0,19°	4,62	5,19	—	—	—	—
1b	200 NaCl-L	30 fr.	5,5	Vak.	—0,03°	—	—	—	—	—	—
2a	100 Zimts.	30 fr.	5,5	N_2	—0,29°	8,37	2,59	15	0°	—	—
2b	100 Zimts.	30 gek.	5,5	N_2	0°	—	—	15	0°	—	—
$3a_1$	100 Zimts.	35 fr.	29	N_2	—0,49°	9,42	2,59	24	0°	1,6 131°	69 %
$3a_2$	100 Zimts.	35 gek.	29	N_2	0°	—	—	24	0°	—	—
3b	100 Crots.	35 fr.	29	N_2	—0,06°	0,5	1,78	24	0°	—	—
3c	100 Fumars.	35 fr.	29	N_2	—0,12°	—	—	24	0°	0,32 284°	17 %
3d	100 NaCl-L	35 fr.	29	N_2	0°	—	—	24	0°	—	—
$5a_1$	50 Crots.	25 fr.	15	Luft	—0,025°	0,20	0,89	20	0°	0,56	81 %
$5a_2$	50 Crots.	25 gek.	15	Luft	0°	—	—	20	0°	geringe Menge Schmiere	
$5b_1$	50 Zimts.	25 fr.	15	Luft	0°	—	—	20	0°	1,24	105 %
$5b_2$	50 Zimts.	25 gek.	15	Luft	0°	—	—	20	0°	1,63	138 %

Erläuterungen zur Tabelle:

Zimts. = Zimtsäure; Crots. = Crotonsäure; NaCl-L = NaCl-Lösung;
Hefe fr. = frische Hefe; Hefe gek. = gekochte Hefe.

In den Tabellen wurden die für die optische Drehung erhaltenen Werte auf die entsprechenden β-Oxysäuren umgerechnet (β-Oxybuttersäure bezw. β-Oxy-β-Phenylpropionsäure). Die Ausbeute der aus Fumarsäure zu erwartenden Äpfelsäure wurde nicht berechnet, da die Drehung dieser Säure sehr stark von der Konzentration und Alkalität ihrer Lösungen abhängt.

Die Ätherrückstände bestanden aus dem jeweiligen unveränderten Ausgangsmaterial, verunreinigt durch Schmieren aus der Hefe.

Zu Versuch 5: Die Versuchstemperatur betrug 10—12°. Die wässerigen Lösungen wurden nach der Bestimmung der optischen Drehung auf 30 ccm eingedampft und in der Hitze mit Ammonsulfat, Phosphorsäure und Alkohol Eiweiß gefällt. Nach Abzentrifugieren der Niederschläge wurde der Alkohol aus den klaren Lösungen abgedampft und dann erst die Extraktion mit Äther vorgenommen.

2. Einwirkung von Hefe bei Gegenwart von Glukose auf Crotonsäure.

Anstatt der bisherigen isotonischen Säurelösungen wurden neutralisierte Crotonsäurelösungen verschiedener Molarität zu Hefesuspensionen vom p_H 3,5 gegeben. Außerdem enthielten die Versuchslösungen 0,22 bis 0,55 Mol Glukose. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Crotonsäure. Die Versuchsdauer betrug 38 Stunden bei 15—21°. Die Aufarbeitung der Versuche erfolgte in gleicher Weise wie unter 1. beschrieben. Nach dem Zentrifugieren wurden die mit NaOH neutralisierten Lösungen auf dem Wasserbad bis zu einem zähen Syrup eingedampft, mit 87 %iger Phosphorsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt, mit geglühtem Natriumsulfat zu einem trockenen Pulver verrieben und 10 Stunden lang mit Äther extrahiert.

Ansätze	Opt. Drehung	Aether-rückstand	% der Einwage
a) 250 ccm 0,025 m Crotonsäurelösung 0,22 Mol Glukose (40 g) 100 g Hefe in 100 ccm Pufferlösung (p_H 2,0)	—0,12°	0,1 g rohe Crotonsäure	16
b) 250 ccm 0,0089 m Crotonsäurelösung 0,55 Mol Glukose (100 g) 240 g Hefe in 300 ccm Pufferlösung (p_H 2,0)	0°	0,15 g rohe Crotonsäure	78,9
c) 250 ccm 0,045 m Crotonsäurelösung 0,55 Mol Glukose Hefe wie in b)	0°	0,4 g rohe Crotonsäure	41,7
d) 0,55 Mol Glukose in 250 ccm Wasser	0°	0,1 g Schmiere, aus der Hefe stammend.	

Die in a) erhaltene optische Drehung ergibt auf β-Oxybuttersäure umgerechnet 0,014 g.

3. Einwirkung von Leberbrei auf Crotonsäure.

In diesen Versuchen hielten wir uns im Wesentlichen an die von Friedmann[79]) in einer analogen Arbeit angegebenen Bedingungen. Je 25 bis 80 g Brei von schlachtfrischer Rindsleber wurden zu der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung gegeben und mit 0,5 bis 1,0 g Crotonsäure (mit NaOH neutralisiert) versetzt. Die Lösungen wurden in großen Pulverflaschen in den Thermostaten gebracht. Durch die Versuchslösung perlte ein lebhafter Sauerstoffstrom, durch die in gleicher Weise angesetzte Kontrollösung ein CO_2-Strom. Eine zweite Kontrolle, die keine Crotonsäure enthielt, lief ebenfalls unter CO_2. Um die Lösungen möglichst steril zu halten, wurden die Gase durch Toluol geleitet. Während der Versuchsdauer von 6 Stunden (in Versuch 1 nur 5 Stunden) wurde bei 37° kräftig gerührt oder geschüttelt. Dann wurden die Lösungen zur Eiweißfällung mit dem sechsfachen Volumen 92 %igen Alkohols versetzt und fest verschlossen in den Eisschrank gebracht. Nach 37stündigem Stehen wurden die Versuchslösungen zentrifugiert und die Rückstände mehrmals mit Alkohol ausgewaschen. Die noch trüben Zentrifugate wurden rasch filtriert, und die so erhaltenen klaren gelben Lösungen bis auf etwa 75 ccm im Vakuum eingedampft; es wurde dabei auf neutrale Reaktion geachtet. Zur Entfernung der Fette wurde mehrere Male ausgeäthert, darauf mit 25 %iger Phosphorsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt und 10 bis 20 Stunden im Kutscher-Steudel mit Äther extrahiert. Die nach dem Abdampfen des Äthers im Vakuum erhaltene Substanz wurde gewogen, unter gelindem Erwärmen in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle geklärt, filtriert, und nach Auffüllen mit Wasser auf 25 ccm im 1 dm-Rohr die optische Drehung bestimmt. Darauf wurden die wässerigen Lösungen zur Entfernung der Crotonsäure mehrmals mit Petroläther ausgeschüttelt. Um evtl. entstandene β-Oxybuttersäure in Crotonsäure überzuführen und als solche nachzuweisen, wurden zu dem Rückstand einige Tropfen 2 n Schwefelsäure zugegeben, erwärmt und ausgeäthert. Nach dem Abdampfen des Äthers hinterblieb eine braune Schmiere, die auf keine Weise zur Kristallisation gebracht werden konnte; sie wies auch keinen Geruch nach Crotonsäure auf.

In Versuch 2 wurden die wässerigen Lösungen nach Bestimmung der optischen Drehung im Exsiccator getrocknet und der Rückstand mehrmals mit Petroläther digeriert. Auch hier

gelang es uns nicht, nachdem auf diese Weise die Crotonsäure entfernt war, in der zurückgebliebenen Schmiere β-Oxybuttersäure nachzuweisen. Eine Trennung von evtl. entstandener β-Oxybuttersäure und noch vorhandener Crotonsäure über die Methylester der Säuren ließ sich ebenfalls nicht durchführen. Wir konnten nach Methylierung des Rückstandes mit Diazomethan keine beim Kp_{13mm} 67—68,5 °(Siedepunkt des β-Oxybuttersäuremethylesters) übergehende Fraktion erhalten.

Versuch	g Crotonsäure	Leberbrei in g	ccm NaCl-Lsg.	Gasraum	Dauer der Aetherextraktion	Aether-Rückstand	Optische Drehung
1a	0,5	25	75	O_2	18 St.	0,47 g	nicht best.
1b	0,5	25	75	CO_2	18 St.	0,48 g	nicht best.
1c	—	25	75	CO_2	18 St.	0,19 g	nicht best.
2a	0,5	25	75	O_2	59 St.	1,18 g	— 0,13 °
2b	0,5	25	75	CO_2	14 St.	0,28 g	— 0,07 °
2c	—	25	75	Luft	13 St.	0,23 g	— 0,09 °
3a	1,0	25	75	O_2	24 St.	0,90 g	0 °
3b	1,0	25	75	CO_2	24 St.	0,76 g	0 °
4a	1,0	80	150	O_2	30 St.	0,79 g	— 0,04 °
4b	1,0	80	150	CO_2	30 St.	1,1 g	— 0,05 °
4c	—	80	150	Luft	30 St.	0,91 g	0 °

c) Versuche zur Acetaldehydabspaltung aus Crotonsäure.

Nach Kühnau[76]) entsteht unter der Einwirkung von Leberextrakt aus β-Oxybuttersäure u. a. Acetaldol.

Wir prüften diese Ergebnisse nach und untersuchten, ob auch Crotonsäure unter denselben Bedingungen Aldol liefert.

Die Säuren wurden als Na-Salze verwendet.

1. Kontrollen:

a) β-Oxybuttersäure wurde einmal allein, einmal mit Alaninzusatz (1:1) mit sek. m/15 Phosphatlösung im Vakuum stehen gelassen.

b) Eine zweite Reihe enthielt β-Oxybuttersäure: 1. unter Sauerstoff, 2. unter Stickstoff in m/15 Phosphatlösung unter Alaninzusatz.

c) Enthielt Crotonsäure, sonst die gleichen Bedingungen wie in b).

2. Versuchsansätze.

a) Die Phosphatlösung wurde durch Leberextrakt nach Kühnau[76]) ersetzt, von dem 140 ccm 49 g frischer Leber entsprachen, und die Versuche wie in 1b und c angesetzt.

b) Eine zweite gleiche Reihe wurde ohne Alaninzusatz durchgeführt.

Ein Kontrollansatz enthielt keine Säure.

Um die Lösungen möglichst steril zu halten, wurden die Gase, unter denen gearbeitet wurde, durch Toluol geleitet.

Die Nachprüfungen auf entstandenen Acetaldehyd wurden bei 1a so ausgeführt, daß wir einen Teil der Versuchslösungen destillierten, einen Teil des Destillats mit fuchsinschwefliger Säure und eine zweite Probe mit ammoniakalischer Silbersalzlösung versetzten. Bei allen übrigen Versuchen wurde von vornherein zum Abfangen des Acetaldehyds Dimedon zugegeben.

Versuch	mg Säure	ccm sek. Phosphatls.	Alanin in g	Gasraum	Dimedon in g	Versuchszeit Std.	Temperatur
$1a_1$	500 β-Oxybutters.	150	—	Vakuum	—	72	15°
$1a_2$	500 β- „	150	0,009	Vakuum	—	72	15°
$1b_1$	147 β- „	200	0,009	N_2	0,45	256	36—38°
$1b_2$	147 β- „	200	0,009	O_2	0,45	239	36—38°
$1c_1$	123 Crotonsäure	200	0,009	N_2	0,45	256	36—38°
$1c_2$	123 Crotonsäure	200	0,009	O_2	0,45	239	36—38°
		ccm Leberextrakt					
2a	720 β-Oxybutters.	140	0,009	N_2	0,4	108	35—38°
2b	620 Crotonsäure	140	0,009	N_2	0,4	108	35—38°
2c	ohne Säure	140	0,009	N_2	0,4	108	35—38°
3a	720 β-Oxybutters.	140	—	N_2	0,4	72	35—38°
3b	720 β-Oxybutters.	140	—	O_2	0,4	72	35—38°
4a	602 Crotonsäure	170	—	N_2	0,4	72	35—38°
4b	602 Crotonsäure	170	—	O_2	0,4	72	35—38°

Wir konnten in keinem der Versuche Acetaldehydbildung feststellen.

d) Einwirkung von Hefe auf Acetaldehyd und Acetaldehyd-Kondensationsprodukte.

Es wurden untersucht Acetaldehyd, Aldol und Acetaldehyd-Kondensationsprodukt nach Tollens[81]).

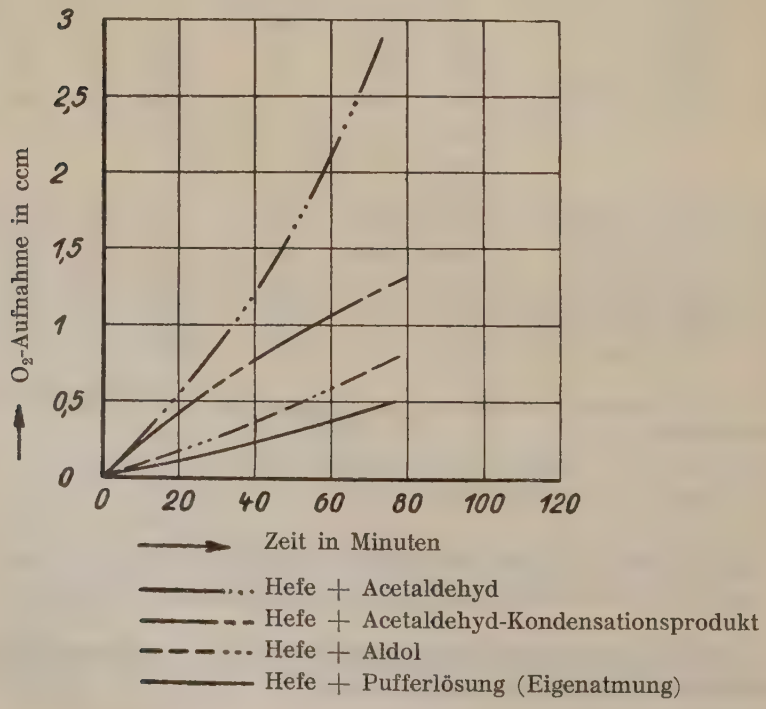
Darstellung des Kondensationsproduktes.

10 g Acetaldehyd wurden zu 500 ccm 2 %iger Barytlauge gegeben und mehrmals kräftig durchgeschüttelt. Nach mehrtägigem Stehen wurde Kohlensäure eingeleitet und von entstandenem Bariumkarbonat und Harzen abfiltriert. Nach Einengen der Lösung wurde mit Schwefelsäure der Rest des Baryts gefällt, filtriert und darauf mit Kalkmilch kurz aufgekocht. Es schied sich nochmals eine zähe gelbe Harzmasse aus, die nach Einleiten von CO_2 durch Filtrieren entfernt wurde. Das klare gelbe Filtrat wurde im Vakuum zu einem zähen gelben Syrup eingedampft, der sich klar in Wasser löste und so zu unseren Versuchen diente.

Bestimmung der Sauerstoffaufnahmen.

Zu 5 ccm Hefesuspension wurden je 1 ccm 0,1 molarer Lösung von Acetaldehyd, Aldol oder Acetaldehyd-Kondensationsprodukt (berechnet auf $C_{10}\ H_{18}\ O_4$) gegeben, sodaß die Molarität der Ansätze 0,016 betrug. Die Kontrollansätze enthielten 1 ccm Phosphatpufferlösung p_H 6.

In den Einsatzgefäßen befanden sich 0,3 ccm 40 %ige KOH.

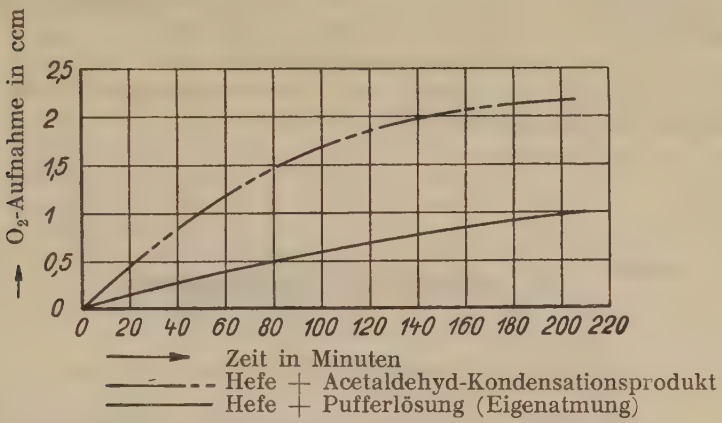


Als Kontrolle lief folgender Ansatz:

5 ccm Phosphatpufferlösung mit 1 ccm Acetaldehydlösung. Es fand keine Sauerstoffaufnahme statt.

Versuch 2 wurde nur mit Aldehydkondensationsprodukt ausgeführt.

Ansätze wie in Versuch 1.



D. Versuche mit β-Oxybuttersäure.

Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.

1. Einwirkung von Hefe.

5 ccm Hefesuspension wurden mit 1 bis 5 ccm 0,1 molarer neutralisierter β-Oxybuttersäurelösung versetzt. Der Kontrollansatz enthielt die entsprechende Menge Phosphatpuffer (p_H 6). Die Lösungen wurden die angegebene Zeit im Thermostaten unter Luft bei 30° geschüttelt.

Die Einsätze enthielten 0,25 ccm 25 %ige Kalilauge. Versuch 1 mit 5 ccm Säurelösung (Molarität der Ansätze 0,05) zeigte nach 40 Minuten eine Sauerstoffaufnahme (in ccm) für Hefe 0,25; Hefe + Säure 0,36; daraus berechnete Differenz für Säure allein 0,10. Es hatten 125 Mol β-Oxybuttersäure 1 Mol Sauerstoff aufgenommen.

Versuch 2 mit 1 ccm Säurelösung (Ansätze 0,017 m) zeigt nach 235 Minuten geringere Sauerstoffaufnahme, als dem Versuch zur Bestimmung der Eigenatmung der Hefe entspricht.

2. Einwirkung von Leber.

Die Ansätze enthielten 1 g möglichst feiner Schnitte von Rindsleber in 5 ccm Phosphatpufferlösung vom p_H 7,0 und 2 ccm 0,5 molarer β-Oxybuttersäurelösung. (Versuchsansätze 0,14 m.) Die Kontrolle enthielt 1 g Leberschnitte in 7 ccm Phosphatpuffer.

Nach 35 Minuten betrug die Sauerstoffaufnahme für die Kontrolle 0,42; für Versuchslösung 1 0,26 ccm,
für Versuchslösung 2 0,38 ccm.

Der Sauerstoffverbrauch der Versuchslösungen blieb hinter demjenigen von Leber allein zurück.

E. Schicksal der Acetessigsäure.

a) Darstellung der Acetessigsäure.

1. Verseifung mit methylalkoholischer Kalilauge.

0,1 Mol Acetessigester wurde mit 2 % Überschuß der äquivalenten Menge methylalkoholischer Kalilauge versetzt (Kalilauge 4 molar). Nach Verdünnen mit 50—100 ccm Methylalkohol und 24—36 stündigem Stehen wurde die Lösung im Vakuum eingeengt und der gelbliche kristalline Rückstand zur Entfernung noch unverseiften Esters mit Äther gewaschen.

Titrimetrische Bestimmungen ergaben, daß die für die Versuche verwandten Substanzen nicht reines acetessigsaures Kalium waren, sondern aus einem Gemisch von acetessigsaurem Kalium und dem Kalium-Enolat des Acetessigesters bestanden. Die wässerige Lösung der Substanz zeigte stark alkalische Reaktion (gegen Phenolphtalein). Nach längerem Stehen tritt jedoch Verseifung des Esters ein, und schon nach einigen Stunden wird der Säureverbrauch zur Neutralisation geringer. Es verbrauchten 5 ccm einer 0,1 molaren Lösung

sofort nach ihrer Bereitung . .	3,55 ccm 0,1 n HCl,
nach 105 Minuten	1,20 ccm 0,1 n HCl,
nach 165 Minuten	0,50 ccm 0,1 n HCl.

2. Verseifung in wässeriger Lösung.

Da die Verseifung in methylalkoholischem Medium nicht vollständig verlief, und wir infolge noch unverseiften Esters

und daraus entstandenen Alkohols stets eine Sauerstoffaufnahme in unseren Versuchen feststellten, wurden unsere Lösungen von acetessigsaurem Na nach Ljunggren[92]) durch Verseifen der wässerigen Lösung des Esters dargestellt. Acetessigester wurde mit 2 % mehr als der berechneten Menge 0,1 n NaOH versetzt und nach ein- bis vierstündigem Stehen im Eisschrank die überschüssige Lauge mit 0,1 n HCl zurücktitriert. Nach mehrmaligem Ausäthern zur Beseitigung des unverseiften Esters wurde die Lösung zur Trockne eingedampft, um den bei der Verseifung entstandenen Alkohol zu entfernen (beim Eindampfen auf nur etwa $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens ließen sich die letzten Spuren von Alkohol nicht entfernen). Der kristalline Rückstand wurde in soviel Wasser aufgenommen, daß wir ungefähr 0,1 molare Lösungen erhielten. Der Acetessigsäuregehalt wurde nach Huppert-Messinger bestimmt. Im Eisschrank aufbewahrt, hielt sich die Lösung ein bis zwei Tage konstant; nach vier Tagen ließ sich z. B. eine Abnahme der Säure von 11,5 % feststellen.

b) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.

1. Einwirkung von Hefe.

Zu 5 ccm von verarmter Hefesuspension (0,5 g Hefe) wurden 1 bis 2 ccm Acetessigsäure wechselnder Molarität gegeben.

Die Kontrollversuche zur Bestimmung der Eigenatmung der Hefe enthielten jeweils die der Acetessigsäure entsprechenden ccm m/15 Phosphatpufferlösung (p_H 6).

In den Einsätzen befanden sich 0,3 ccm 40 %iger Kalilauge.

P_H der Versuche 1 bis 8 betrug 6,0; von den Versuchen 9 und 10 dagegen 7,0.

Die Versuchslösungen wurden mehrere Stunden unter Luft im Thermostaten bei 30° geschüttelt.

Von den ungefähr 20 zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme ausgeführten Versuchen führen wir nur einige Durchschnittsbeispiele an, da die meisten Versuche nichts Neues bringen.

In den Tabellen geben wir unter „Differenz“ den Sauerstoff m e h r verbrauch der Versuchsansätze gegenüber der Eigenatmung der Hefe an.

Zur Beurteilung der von der Acetessigsäure aufgenommenen Sauerstoffmenge wird das Molverhältnis Acetessigsäure zu verbrauchtem Sauerstoff nach Beendigung jedes Versuches angegeben.

Zu den Versuchen 1, 3, 4 und 5 hatten ältere Acetessigsäurelösungen gedient, während alle übrigen Versuche mit einwandfreien, alkoholfreien Lösungen ausgeführt waren.

In Versuch 5 entsprechen 5 ccm Hefesuspension 0,3 g Hefe. Die Versuche 9 und 10 enthalten 6 ccm Hefesuspension (entspr. 0,6 g Hefe).

Versuche	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	Molarität der Ansätze	Zeit in Minuten	Eigenatmung	Sauerstoffaufnahme in ccm: Ansätze I.	Ansätze II.	Differenz I.	Differenz II.	Molverhältnis Acetessigsäure : O_2 I.	Molverhältnis Acetessigsäure : O_2 II.
1	1	0,14	0,023	30	0,35	0,81	0,40	0,46	0,05		
				195	1,37	1,50	1,44	0,13	0,07		
				285	1,82	3,85	1,90	2,03	0,08	I. 0,14 : 0,09	
										II. 0,14 : 0,003	
2	1	0,15	0,025	30	0,58	0,64	0,59	0,06	—0,01		
				180	2,44	2,16	2,04	—0,28	—0,40		
				305	3,56	2,90	3,04	—0,66	—0,52	Hemmung der Eigenatmung	
3	1	0,14	0,023	130	1,19	1,08	1,24	—0,11	0,05		
				375	2,98	3,47	3,87	0,49	0,89	I. 0,14 : 0,021	
										II. 0,14 : 0,04	
4	5	0,12	0,06	55	0,42	1,98	—	1,56	—	0,6 : 0,07	
5	2	0,12	0,034	95	1,80	2,95	—	1,15	—	0,24 : 0,05	
6	5	0,14	0,07	65	0,75	0,24	0,85	—0,51	0,10	I. Hemmung	
										II. 0,7 : 0,005	
7	5	0,14	0,07	65	0,44	0,83	—	0,39	—		
				275	1,44	2,31	—	0,87	—	0,7 : 0,039	
8	2	1,0	0,29	60	1,30	0,77	1,04	kein Sauerstoff-			
				150	2,75	1,68	1,80	mehrverbrauch			
9	1	1,0	0,166	45	0,10	0,90	—	0,80	—	1,0 : 0,036	
10	0,5	0,14	0,01	90	5,56	6,24	—	0,68	—		
				265	10,1	11,1	—	1,00	—		
				425	10,9	12,66	—	1,76	—	0,07 : 0,078	

2. Versuche mit Rindsleberschnitten.

Zu 1 g Rindsleberschnitten in 5 ccm m/15 sekundärer Phosphatpufferlösung wurden 1 bis 2 ccm Acetessigsäure wechselnder Molarität gegeben.

In den Einsätzen befanden sich 0,5 ccm, bei Versuch 3 0,8 ccm 40 %ige Kalilauge.

Die Versuchstemperatur betrug 37 °, bei Versuch 2 nur 36 °.

Sonstige Bedingungen wie für Hefeversuche beschrieben.

Versuch-Nr.	ccm Acetessigsäure	Molarität der Ansätze	Zeit	Sauerstoffaufnahme in ccm: Eigenatmung	Versuchsansatz	Differenz	Verhältnis Acetessigsäure : O_2 (Milli-Mole)
1a	2 ccm 0,1 m	0,029	15'	0,24	0,28	0,04	
			75'	0,46	0,49	0,03	0,2 : 0,0013
1b	2 ccm 0,5 m	0,14	25'	0,24	0,44	0,20	
			75'	0,46	0,72	0,26	1,0 : 0,012
1c	2 ccm 1,0 m	0,29	25'	0,24	0,51	0,27	2,0 : 0,012
2	2 ccm 0,2 m	0,057	15'	0,19	0,19	0,0	
			50'	0,29	0,27	—0,02	—
3	2 ccm 0,5 m	0,14	15'	0,06	0,07	0,01	kein O_2
			55'	0,57	0,57	—	Mehrverbrauch

3. Versuche mit Rattenleberschnitten.

Die Versuchslösungen enthielten 1 g Rattenleberschnitte in 2 bis 4 ccm Phosphat-Ringerlösung. Die zugesetzten Mengen Acetessigsäure variierten zwischen 1 und 2 ccm 0,2 bis 0,5 molarer frisch bereiteter Lösungen; die Ansätze von Versuch 2 enthielten mehrere Tage alte Acetessigsäurelösungen.

In den Einsätzen befanden sich 0,5 ccm 40 %ige Kalilauge.

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	Molarität der Ansätze	Zeit in Min.	Sauerstoffaufnahme in ccm berechnet für 100 mg Trockengewicht (Milli-Mol): Eigenatmung	Ansätze I.	Ansätze II.	Differenz I.	Differenz II.	Verhältnis Acetessigsäure : O_2 I.	Verhältnis Acetessigsäure : O_2 II.
1	1	0,5	0,1	40	0,48	0,57	—	0,09			
				85	0,80	0,60	—	—0,20		Hemmung der Eigenatmung	
2	1	0,5	0,1	40	0,48	1,17	1,04	0,69	0,56		
				85	0,80	1,59	1,39	0,79	0,59	I. 0,5 : 0,035	II. 0,5 : 0,026
3	1	0,1	0,033	50	0,28	0,35	—	0,07	—		
				90	0,48	0,62	—	0,14	—	0,1 : 0,007	
5	1	0,1	0,033	50	0,40	0,49	0,57	0,09	0,17		
				80	0,60	0,69	0,79	0,09	0,19		
				120	0,87	0,97	1,06	0,10	0,19	I. 0,1 : 0,004	II. 0,1 : 0,008
6	1	0,2	0,07	30	0,34	0,51	0,34	0,17	0,0		
				50	0,41	0,77	0,52	0,36	0,11		
				60	0,48	0,84	0,61	0,36	0,13	I. 0,2 : 0,016	II. 0,2 : 0,006
7a	1	0,2	0,05	30	0,21	0,36	—	0,15	—		
				50	0,27	0,52	—	0,25	—		
				70	0,37	0,67	—	0,30	—	0,2 : 0,013	
7b	2	0,2	0,1	30	0,21	0,26	—	0,05	—		
				50	0,27	0,40	—	0,13	—		
				70	0,37	0,53	—	0,16	—		
				100	0,54	0,67	—	0,13	—	0,4 : 0,006	

Die Versuche 1 und 2 enthielten 4 ccm, die Versuche 3, 5 und 6 sowie 7b je 2 ccm und Versuch 7a 3 ccm Phosphat-Ringerlösung.

Versuch 2 enthielt einige Tage alte Acetessigsäurelösung.

c) Dekarboxylierung der Acetessigsäure.

1. Bestimmung der Kohlensäure-Entwicklung.

Die Bestimmung der Dekarboxylierung von Acetessigsäure wurde in den Barcroft-Warburg-Schüttelgefäßen ausgeführt, sodaß die entwickelte Kohlensäure sofort manometrisch gemessen werden konnte. Die Versuche wurden mit Kohlensäure gesättigten Lösungen angesetzt. Wir verwendeten 0,2 bis 0,3 molare Lösungen von acetessigsaurem Na unter Zusatz von Alanin oder Prolin. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nur CO_2 gesättigte Acetessigsäurelösung enthielt; Kohlensäure-Entwicklung wurde dabei nicht festgestellt. Die Versuchslösungen wurden mehrere Stunden bei 35° im Thermostaten geschüttelt.

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	Alanin ccm	Alanin Molarität	Molverh. Acetessigsäure: Alanin	P_H	Zeit in Min.	CO_2 in ccm	Molverh. Acetessigsäure: CO_2	Dekarboxylierte Acetessigsäure i. %
1a	2	0,31	2	0,22	0,62: 0,44		60	0,09		
							150	0,17		
							240	0,26		
							1020	0,86	0,62: 0,038	6,1
1b	2	0,31	1	0,22	0,62: 0,22		60	0,07		
							150	0,13		
							240	0,21		
							1020	0,80	0,62: 0,036	5,9
2a	2	0,23	2	0,23	0,46: 0,46	7,4	45	0,07		
							90	0,12		
							135	0,16	0,46: 0,007	1,5
3a	2	0,26	2	0,23	0,52: 0,46	7,2	50	0,04		
							100	0,07		
							205	0,20		
							960	0,71	0,52: 0,03	5,9
				Prolin						
2b	2	0,23	2	0,23	0,46: 0,46	7,8	45	0,12		
							90	0,22		
							135	0,31	0,46: 0,014	3,0
3b	1	0,26	1	0,23	0,26: 0,23	7,4	50	0,07		
							100	0,17		
							205	0,31		
							960	0,83	0,26: 0,037	14,2

2. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme von Aceton.

Die beiden ausgeführten Versuche 1 und 2 enthielten je:
3 ccm Hefesuspension (entsprechend 0,3 g Hefe),
2 ccm Phosphatpufferlösung p_H 6,
5 ccm 0,1 m Acetonlösung (Ansätze 0,05 molar).
Ein Kontrollansatz enthielt 3 ccm Hefesuspension und 7 ccm Phosphatpufferlösung.

In den Einsatzgefäßen befanden sich 0,25 ccm 40 %ige KOH.

Es ließ sich keine Sauerstoff m e h r aufnahme der Versuchslösungen gegenüber den Kontrollösungen feststellen. Wir erhielten jeweils für beide Lösungen die gleichen Werte.

d) Quantitative Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure.

I. Bestimmung nach Huppert-Messinger.

Die Ansätze der Versuche 1 und 2 (Ansätze S. 52 Versuch 1 und 2) wurden nach 5- bezw. 6stündigem Schütteln im Thermostaten sofort mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und destilliert. In Versuch 3 (Tabelle S. 52 Versuch 3) blieben die Ansätze nach 7stündigem Schütteln im Thermostaten ruhig über Nacht stehen. Ansäuern und nachfolgende Destillation wurden erst am nächsten Morgen ausgeführt. Im Destillat wurde jeweils das entstandene Aceton jodometrisch bestimmt. 6 ccm 0,1 n Jodlösung entsprechen 1 ccm 0,1 m Acetessigsäurelösung.

Zur Kontrolle der Einwirkung der Pufferlösung auf die Acetessigsäure wurden die Parallelversuche mit Acetessigsäure und Pufferlösung allein (ohne Hefe) genau wie die Versuchsansätze aufgearbeitet. Außerdem wurden die Ansätze mit Hefe und Pufferlösung ohne Acetessigsäure, die zur Messung der Eigenatmung dienten, gleichfalls nach Huppert-Messinger titriert, um den Einfluß der aus der Hefe stammenden, Jod verbrauchenden Substanzen zu eliminieren.

In der folgenden Tabelle wurden die Versuchsergebnisse zusammengestellt. Der Jodverbrauch ist in ccm 0,1 n Jodlösung angegeben.

Spalte V bildet die Differenz IV—II, d. h. den Jodverbrauch nach Abzug des Jodverbrauches der aus der Hefe stammenden reduzierenden Substanzen.

Spalte VI gibt die Differenz V—III an, die Änderung des Jodverbrauches während des Versuches.

I.	II.			III.			IV.				V.	VI.
Versuch	Jodverbrauch v. Hefe + Puffer			Jodverbrauch v. Acetessigsäure + Puffer			Jodverbrauch v. Acetessigsäure + Hefe + Puffer					
	I.	II.	Mittel	I.	II.	Mittel	I.	II.	III.	Mittel		
1	1,62	0,68	1,15	8,25	8,20	8,23	11,15	8,91	—	10,03	8,88	0,65
2	0,67	0,67	0,67	8,45	8,66	8,55	11,05	11,0	—	11,02	10,35	1,80
3	0,80	0,98	0,89	8,23	—	8,23	1,71	1,17	1,47	1,45	0,56	7,67

Daraus berechnete Anzahl ccm 0,1 m Acetessigsäurelösung:

In Versuch	vor dem Versuch	nach dem Versuch	Änderung
1	1,38 ccm	1,48 ccm	+ 7 %,
2	1,45 ccm	1,72 ccm	+ 19 %,
3	1,38 ccm	0,093 „	— 93 %.

II. Kolorimetrische Bestimmung mit der Eisenchloridmethode.

a) Ausarbeiten der Methode.

Die kolorimetrischen Versuche wurden mit einem Dubosque-Kolorimeter der Firma Hellige ausgeführt. Wir verglichen die Eisenchloridfärbung unserer Versuchslösung mit der einer Acetessigsäurelösung von bekanntem Gehalt und möglichst gleicher Konzentration. Die einer bestimmten Grundeinstellung der Kontrollösung entsprechende Schichthöhe der Versuchslösung wurde dreimal nacheinander eingestellt. Außerdem wurde, um individuelle Fehler auszuschalten, die Schichthöhe der Vergleichslösung 3 bis 5 mal variiert und aus allen errechneten Werten das Mittel genommen.

1. Einfluß der zugegebenen Menge Ferrichlorid.

Mit einer 0,01 molaren Acetessigsäurelösung mit gleichbleibendem Ferrichloridgehalt wurden 0,002 molare Lösungen (Konzentrationsverhältnis 5: 1) bei steigendem Zusatz von Ferrichlorid verglichen. Jeweils 5 ccm dienten zum kolorimetrischen Vergleich.

Verhältnis von Acetessigsäure: $FeCl_3$	1:1,2	1:1	1:1,2	1:1,3	1:1,2	1:1,8
ccm 0,1 m Ferrichlorid	0,6	0,1	0,6	0,13	0,6	0,18
Vorhandene Molarität der Acetessigsäure	0,01 : 0,002		0,01 : 0,002		0,01 : 0,002	
Am Kolorimeter abgelesene Werte	28,5 : 168,4		17,8 : 94,14		17,8 : 90,81	
Kolor. bestimmte Molarität der Acetessigsäure	0,01 : 0,00169		0,01 : 0,00189		0,01 : 0,00196	
Fehler in %	— 15,5 %		— 5,5 %		— 2 %.	

Die gefundenen reproduzierbaren Fehler rühren von der Eigenfärbung des Ferrichlorids her. Bei größerem $FeCl_3$-Überschuß wurde niemals Gleichheit des Farbtones erhalten. Das günstigste Molverhältnis zwischen Acetessigsäure und Eisenchlorid ergibt sich aus diesem Versuch zu 1:1,3 bis 1:1,8.

2. Einfluß der Acetessigsäure-Konzentrationen.

Dieses optimale Verhältnis von 1:1,3 wurde in den Versuchen über die Genauigkeit der Bestimmung bei verschiedenen Verdünnungen der Acetessigsäurelösungen eingehalten.

ccm 0,1 m Acetessigsäurelösung	1 : 1		1 : 0,5		0,5 : 0,1	
ccm 0,1 m $FeCl_3$	1,3	1,3	1,3	0,6	0,6	0,13
Mit Wasser aufgefüllt auf ccm	5	5	5	5	5	5
Vorhandene Molarität der Acetessigsäure	0,02 : 0,02		0,02 : 0,01		0,01 : 0,002	
Am Kolorimeter abgelesene Werte	23,8 : 23,8		23,8 : 47,99		28,5 : 167,42	
Kolor. bestimmte Molarität der Acetessigsäure	0,02 : 0,02		0,02 : 0,00992		0,01 : 0,0017	
Fehler in %	0 %		— 0,8 %		— 15 %.	

3. Einfluß von Phosphat auf die Genauigkeit der Bestimmung.

Diese Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei den Bestimmungen in den Versuchsansätzen (siehe S. 58). Die ausfallenden Niederschläge von Eisenphosphat wurden abfiltriert.

Versuch 1.

ccm 0,1 m Acetessigsäure	1	2	2	3
ccm 0,1 m Phosphatlösung	5	5	5	5
ccm 0,1 m Ferrichlorid	2	3,5	3,5	5
ccm Alkohol	17	14,5	14,5	12
Vorhandene Molarität der Acetessigsäure	0,004 : 0,008		0,008 : 0,012	
Kolorimeterwerte	27,75 : 14,09		12,25 : 8,3	
Kolorimetr. bestimmte Molarität der Acetessigsäure	0,004 : 0,0079		0,008 : 0,0118	
Fehler in %	— 1,5 %		— 1,7 %.	

Versuch 2.

ccm 0,1 m Acetessigsäure	2	4
ccm 0,1 m Phosphatlösung	5	5
ccm 0,1 m Ferrichlorid	3,5	8,5
ccm Alkohol	14,5	7,5
Vorhandene Molarität der Acetessigsäure	0,008 : 0,016	
Kolorimeterwerte	20,74 : 10,4	
Kolorimetr. bestimmte Molarität der Acetessigsäure	0,008 : 0,0159	
Fehler in %	— 0,7 %.	

Versuch 3.

ccm 0,5 m Acetessigsäure	1	2	2	3
ccm 0,1 m Phosphatlösung	5	5	5	5
ccm 1 m Ferrichlorid	0,8	1,6	1,6	2,3
ccm Alkohol	18,2	16,4	16,4	14,7
Vorhandene Molarität der Acetessigsäure	0,02 : 0,04		0,04 : 0,06	
Kolorimeterwerte	29,07 : 15,13		16,92 : 11,35	
Kolorimetr. bestimmte Molarität der Acetessigsäure	0,02 : 0,00384		0,04 : 0,0596	
Fehler in %	— 4 %		— 0,7 %.	

In den späteren Versuchen wurden die kolorimetrischen Bestimmungen stets mit 0,1 molarer Ferrichloridlösung ausgeführt. Deshalb wurden, sobald 0,5—1 molare Acetessigsäurelösungen für die Versuche verwendet wurden, die zu kolorimetrierenden Lösungen immer auf 250 statt auf 25 ccm mit Alkohol aufgefüllt.

Ausführung der Bestimmung.

Die Acetessigsäurebestimmung in den Ansätzen mit Hefe oder Leber wurde nun folgendermaßen durchgeführt:

Nach Abbruch des Versuches wurden die Suspensionen (zwischen 4 bis 7 ccm) zentrifugiert und die Zentrifugate bei Verwendung 0,1 molarer Acetessigsäure auf 25 ccm, bei Verwendung 0,5 bis 1,0 molarer Säurelösung auf 250 ccm mit Alkohol aufgefüllt. Je 5 ccm davon versetzten wir je nach der Konzentration der Versuchslösungen mit 0,2 bis 1,7 ccm alkoholischer 0,1 molarer Ferrichloridlösung, sodaß das molare Verhältnis Acetessigsäure zu Ferrichlorid rund 1:1,6 betrug. Vor dem Kolorimetrieren wurden die Lösungen filtriert.

4. Bestimmung der Adsorption an Hefe und Lebergewebe.

Zur Unterscheidung von den „Kontrollen", die die reinen Vergleichslösungen darstellten, nannten wir die Versuche, die dazu dienten, die Abnahme der Acetessigsäure in den ersten Minuten durch Adsorption festzustellen, „Schnellversuche". Diese Adsorption wurde bestimmt durch kolorimetrischen Vergleich mit den Kontrollen.

α) Adsorption an Hefe.

Je 1,2 oder 3 ccm von Acetessigsäurelösungen verschiedener Molaritäten wurden mit 5 ccm Hefesuspension (entsprechend 0,5 g Hefe) versetzt, kräftig durchgeschüttelt und sofort abzentrifugiert. Daran schloß sich die kolorimetrische Bestimmung an. Die Ergebnisse wurden in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	p_H der Ansätze	Molarität der Ansätze	Kolorimeter-Werte	Kolor. best. Molarität nach dem Versuch	Abnahme in %	Abnahme in mg
12c	4	0,5	7,0	0,22	20:21,1	0,209	5,2	10,2
11c	3	0,5	7,0	0,198	27:29,1	0,183	7,3	10,9
11b	2	0,5	7,0	0,143	23:25,1	0,131	8,4	8,4
12d	2	0,5	7,0	0,143	15:14,5	0,148	—1,0 (Zunahme)	—1,0
14	2	0,5	7,0	0,143	30:30,2	0,1425	0,7	0,7
15	2	0,5	7,0	0,143	30:29,8	0,144	—1,0 (Zunahme)	—1,0
11a	1	0,5	7,0	0,083	30:34,5	0,072	13,0	7,5
12a	1	0,5	7,0	0,083	30:31,4	0,0796	4,4	2,4
13b	4	0,1	7,0	0,044	20:21,4	0,041	6,6	2,6
13a	2	0,1	7,0	0,029	33:33,8	0,028	2,6	0,5
11	1	0,1	3,1	0,0166	30:31,7	0,0157	5,6	0,6

β) Adsorption an Rindsleber.

1 g möglichst dünner Schnitte von Rindsleber wurden in 5 ccm Ringer- oder Phosphatlösung mit der angegebenen Menge Acetessigsäurelösung kurz durchgeschüttelt, zentrifugiert und kolorimetriert.

Die Versuche 4, 5a und 5b waren mit Ringerlösung, die Versuche 2 und 3 mit sekundärer Phosphatlösung angesetzt worden.

Schnellversuche mit Rindsleber.

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	p_H der Ansätze	Molarität der Ansätze	Kolorimeter-Werte	Kolor. best. Molarität nach dem Versuch	Abnahme in %	Abnahme in mg
5b	2	1,0	7,0	0,286	45:47,8	0,263	5,9	12,2
5a	1	1,0	7,0	0,166	45:49	0,152	8,2	8,4
4	2	0,5	7,0	0,143	45:47,3	0,136	4,8	4,9
3	2	0,5	7,2	0,143	45:47	0,137	4,2	4,3
2	2	0,2	7,2	0,057	15:17,4	0,049	13,7	5,6

γ) Adsorption an Rattenleber.

Ungefähr 1 g möglichst feiner Schnitte von schlachtfrischer Rattenleber wurden in der jeweils angegebenen Menge vorgewärmter Phosphat-Ringerlösung suspendiert und mit der angeführten Lösung von acetessigsaurem Na versetzt. Nach kurzem Durchschütteln wurde zentrifugiert, mit Alkohol verdünnt und kolorimetriert. Nachdem Versuche ergeben hatten, daß das roh eingewogene Frischgewicht an Leberschnitten dem durch Trocknen bei 100° ermittelten Trockengewicht nicht proportional ist, wurde in einigen Versuchen das Trockengewicht der jeweils verwendeten Schnitte nach Beendigung des Versuches bestimmt und die Werte entsprechend umgerechnet.

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	ccm Phosphat-Ring. Lösg.	Molarität der Ansätze	Trock.-Gew. in mg	Kolorimeter-Werte	Molarität nach dem Versuch	Abnahme im Versuch %	Abnahme im Versuch mg	Abnahme umgerechnet für 100 mg Trock.-Gew. %	Abnahme umgerechnet für 100 mg Trock.-Gew. mg
1	1	0,5	4	0,1	71,8	30:32,8	0,091	8,5	4,3	11,7	5,9
8b	2	0,2	2	0,1	—	18:21,7	0,083	17,0	7,0	—	—
2	1	0,36	4	0,072	55,3	45:47,5	0,068	5,3	1,9	9,9	3,7
6	1	0,2	2	0,066	65,8	12:15,6	0,051	23,5	4,8	35,7	7,4
8a	1	0,2	3	0,05	—	16:16,7	0,048	4,2	0,8	—	—
3	1	0,1	2	0,033	—	30:30,2	0,0328	0,7	0,07	—	—

b) Versuche zur Bestimmung des Abbaues der Acetessigsäure durch Hefe oder Leber.

1. Versuche mit Hefe.

Die Versuchsansätze entsprachen denen, die zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme gedient hatten (S. 52). Sie

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	Molarität der Ansätze	Versuchsdauer in Min.	Kolorimeterwerte Kontrolle : Versuch a	Kolorimeterwerte Kontrolle : Versuch b	Molarität nach dem Versuch a	Molarität nach dem Versuch b	Abnahme insgesamt in % a	Abnahme insgesamt in % b	Abnahme insgesamt in mg a	Abnahme insgesamt in mg b	Abnahme nach Abzug des Schnellversuchs in %	Abnahme nach Abzug des Schnellversuchs in mg
8a	2	1,0	0,286	150	12,5 : 14,5	—	0,247	—	13,8	—	28,4	—	—	—
8b	2	1,0	0,286	210	12,5 : 14,4	—	0,248	—	13,2	—	27,2	—	—	—
14a	2	0,5	0,143	180	30 : 29,5	30 : 29,9	0,145	0,1435	—1,0	—1,0	scheinbare Zunahme um 1 mg			
14b	2	0,5	0,143	300	25 : 26	15 : 18,5	0,138	0,116	3,9	19,0	4,0	19,6	3,2	3,3
15	2	0,5	0,143	105	30 : 32,6	30 : 32,2	0,132	0,133	8,0	6,8	8,2	7,0	8,0	8,2
17c	3	0,1	0,038	60	11 : 12,9	—	0,032	—	14,7	—	4,5	—	—	—
18b	3	0,1	0,038	180	7,3 : 10,1	—	0,027	—	27,8	—	8,6	—	—	—
17b	2	0,1	0,029	60	14 : 18,4	—	0,022	—	24,0	—	4,9	—	—	—
17a	1	0,1	0,017	60	30 : 38,9	—	0,013	—	23,0	—	2,3	—	—	—
18a	1	0,1	0,017	180	22 : 26,3	—	0,014	—	16,4	—	1,6	—	—	—
$16a_1$	1	0,1	0,017	150	30 : 36	—	0,0139	—	16,6	—	1,7	—	11,0	—
$16b_1$ Gl, O_2	1	0,1	0,017	150	30 : 35,1	—	0,0142	—	14,5	—	1,5	—	—	—
$16c_1$ Gl, N_2	1	0,1	0,017	150	30 : 34,6	—	0,0145	—	12,9	—	1,3	—	—	—
$16a_2$	1	0,1	0,017	270	30 : 43,3	—	0,0115	—	30,7	—	3,2	—	25,1	2,6
$16b_2$ Gl, O_2	1	0,1	0,017	270	30 : 44	—	0,0113	—	31,8	—	3,3	—	—	—
$16c_2$ Gl, N_2	1	0,1	0,017	270	30 : 41,8	—	0,0119	—	28,2	—	2,9	—	—	—

wurden wie bei den Schnellversuchen beschrieben für die kolorimetrische Bestimmung aufgearbeitet. Auch diejenigen Versuche, für die keine Sauerstoffaufnahme angegeben ist, wurden in der Barcroft - Warburg - Schüttelapparatur durchgeführt. Wenn für die Sauerstoffaufnahme und die kolorimetrischen Versuche verschiedene Zeiten angegeben sind, wurden die Ansätze nach Beendigung der manometrischen Messungen bei geöffneten Manometerhähnen weiter geschüttelt. Die Versuchstemperatur betrug 30°. Die gefundenen Werte wurden in vorstehender Tabelle zusammengestellt.

Zu den Versuchen mit Hefe.

Bei Unterteilung der Spalten in a und b gilt a stets für lebende, b für gekochte Hefe.

Die Schnellversuchswerte wurden nur von den für Versuche mit frischer Hefe erhaltenen Werten abgezogen.

Zu Versuch 16.

P_H der Ansätze vor dem Versuch betrug 3,1. Die Hefe war in Kaliumchlorid-Salzsäure Pufferlösung vom p_H 2,0 verarmt worden. Es war pro Ansatz 1 ccm einer 1,5 molaren Glukoselösung zugegeben. Gl, O_2 bedeutet Zusatz von Glukose und Arbeiten unter Sauerstoff. Gl, N_2 bedeutet Zusatz von Glukose und Arbeiten unter Stickstoff.

Zu Versuch 16 wurde eine Kontrolle ausgeführt, in der Acetessigsäure allein mit Puffer gleichzeitig mit den Hefeversuchen 150 bezw. 240 Minuten geschüttelt wurde (molare Konzentration der Ansätze = 0,017). Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure:

Zeit in Minuten	150	240
Kolorimetr. bestimmte Molarität nach dem Versuch	0,017 : 0,14	0,017 : 0,012
Abnahme in %	15,2 %	29,6 %
Abnahme in mg.	1,6 mg	3,0 mg.

Vergleich der Adsorption an toter und lebender Hefe.

Ansätze (siehe S. 52 Versuch 9 zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme). 1 ccm 1,0 m Acetessigsäurelösung wird in a) zu 5 ccm frischer, in b) zu der gleichen Menge gekochter Hefesuspension gegeben (Molarität der Ansätze 0,166). Es wurde hier die Mehrabnahme der Acetessigsäure in den Versuchen mit toter Hefe gegenüber denen mit lebender Hefe kolorimetrisch bestimmt.

Versuchszeit in Minuten	120	180	300
Kolorimeterwerte lebende Hefe : tote Hefe	48,1 : 50	47,9 : 50	47,5 : 50
Daraus berechnetes Verhältnis der Konzentrationen der Säure in Verss. lebende Hefe : tote Hefe	1 : 0,96	1 : 0,956	1 : 0,956
Mehrabnahme bei toter Hefe in %	4 %	4,4 %	4,4 %.

Wie vorstehender Versuch und Nr. 14 und 15 der Tabelle S. 61 zeigen, ist die Abnahme der Acetessigsäure in den Versuchen mit toter Hefe gleich oder größer als in denen mit lebender Hefe. Die übrigen Versuche, zu denen keine Parallelversuche mit gekochter Hefe vorliegen, können daher ebenfalls nicht als Beweis dafür angesehen werden, daß die Acetessigsäure fermentativ verändert wird.

2. Versuche mit Schnitten von Rindsleber.

Die Ansätze zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme (S. 53) wurden nach der bei den einzelnen Versuchen angegebenen Zeit aus dem Thermostaten genommen und die Abnahme der Acetessigsäure kolorimetrisch bestimmt.

Versuche 4 und 5 wurden in der Tabelle S. 53 nicht angeführt, da sie sich in der Sauerstoffaufnahme nicht von den vorhergehenden Versuchen unterscheiden.

Die Versuchsergebnisse wurden in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Erläuterungen zur Tabelle.

Bei Unterteilung der Spalten in a und b gilt a stets für lebende, b für kurz aufgekochte Leber.

Versuch 4 und 5 enthalten 5 ccm Ringerlösung anstelle von 5 ccm sekundärer Phosphatpufferlösung.

Die Schnellversuche wurden nur von den Werten, die wir für Versuche mit frischer Leber erhielten, abgezogen.

Die Abnahme ist in den Versuchen mit toter Leber von 4 % geringer bis zu 12 % größer als in den Versuchen mit frischer Leber. Der Unterschied in den Versuchsergebnissen ist wohl zum Teil in der nicht ganz gleichmäßigen Schnittdicke der verwendeten Leberschnitte begründet.

Eine mit der Versuchsdauer steigende Abnahme konnte nicht beobachtet werden; wir erhielten nach 60 Minuten die gleiche Abnahme wie nach 210 Minuten.

Versuche mit Schnitten von Rindsleber.

Versuch	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	Molarität der Ansätze	Versuchsdauer in Min.	Kolorimeterwerte Kontrolle : Versuch a	Kolorimeterwerte Kontrolle : Versuch b	Molarität nach dem Versuch a	Molarität nach dem Versuch b	Abnahme insgesamt in % a	Abnahme insgesamt in % b	Abnahme insgesamt in mg a	Abnahme insgesamt in mg b	Abnahme nach Abzug des Schnellversuches in %	Abnahme nach Abzug des Schnellversuches in mg
1c	2	1,0	0,286	60	24,4 : 20	—	0,232	—	18,7	—	38,5	—	—	—
5b	2	1,0	0,286	210	45 : 45	45 : 56,6	0,238	0,227	16,7	20,5	34,4	42,2	10,8	22,2
5a	1	1,0	0,166	180	45 : 58,0	45 : 58,6	0,131	0,128	22,4	23,2	23,0	23,9	14,2	14,6
1b	2	0,5	0,143	60	30 : 38,4	—	0,112	—	21,9	—	22,6	—	—	—
3	2	0,5	0,143	60	60 : 63,7	—	0,135	—	5,8	—	6,0	—	1,6	1,7
4	2	0,5	0,143	75	45 : 59,4	45 : 51,3	0,108	0,125	24,2	12,3	24,9	12,7	19,4	20,0
2	2	0,2	0,057	120	15 : 20	—	0,043	—	25,0	—	10,3	—	11,3	4,7
1a	2	0,1	0,029	60	6 : 6,6	—	0,026	—	9,1	—	1,8	—	—	—

Versuche mit Rattenleberschnitten.

Versuch Nr.	Acetessigsäure ccm	Acetessigsäure Molarität	ccm Phosphat-Ringerlös.	Molarität der Ansätze	Trokkengewicht in mg	Versuchsdauer in Min.	Total-Sauerstoffaufnahme in ccm	Kolorimeterwerte Kontrolle : Versuch	Molarität nach dem Versuch	Abnahme insgesamt im Versuch in %	Abnahme insgesamt im Versuch in mg	Abnahme umgerechnet auf 100 mg Trgw. in %	Abnahme umgerechnet auf 100 mg Trgw. in mg	nach Abzug des Schnellversuches in %	nach Abzug des Schnellversuches in mg
7b O_2	2	0,2	2	0,1	79,3	100	n. 100' 0,13	18 : 21,6	0,083	16,7	6,9	21,1	8,7	—	—
7b N_2	2	0,2	2	0,1	62,4	100	—	18 : 21,1	0,085	14,7	6,0	23,5	9,6	—	—
7b gek.	2	0,2	2	0,1	78,3	100	—	18 : 22,0	0,082	18,2	7,5	23,1	9,5	—	—
8b I	2	0,2	2	0,1	nicht	15	nicht best.	18 : 20,7	0,087	13,0	5,4	—	—	—	—
8b II	2	0,2	2	0,1	best.	30	nicht best.	18 : 20,0	0,090	10,0	4,1	—	—	—	—
1 I	1	0,5	4	0,1	80,9	85	n. 85' 0,05	30 : 35,7	0,084	16,0	8,2	19,8	10,2	8,1	4,2
1 II	1	0,5	4	0,1	94,7	85	keine O_2-Aufnahme	30 : 33,6	0,089	10,7	5,5	11,3	5,8	—0,4 (Zunahme!)	—0,2
2 I	1	0,36	4	0,071	78,7	85	n. 85' 0,79	45 : 51,4	0,0625	12,5	4,6	15,9	5,9	6,0	2,2
2 II	1	0,36	4	0,071	83,1	85	n. 85' 0,59	45 : 51,2	0,0628	12,0	4,5	14,4	5,3	4,5	1,7
6 I	1	0,2	2	0,067	51,1	60	n. 60' 0,36	12 : 17,8	0,045	32,6	6,7	63,8	13,1	28,1	5,8
6 II	1	0,2	2	0,067	40,7	90	n. 50' 0,11	12 : 16,1	0,050	25,5	5,3	62,7	12,9	27,0	5,6
7a O_2	1	0,2	3	0,05	72,0	80	n. 80' 0,32	16 : 22,2	0,036	28,0	5,8	38,9	8,0	—	—
8a I	1	0,2	3	0,05	—	15	nicht best.	16 : 18,2	0,044	12,1	2,5	—	—	—	—
8a II	1	0,2	3	0,05	—	30	nicht best.	16 : 18,2	0,044	12,1	2,5	—	—	—	—
3 I	1	0,1	2	0,033	93,7	120	n. 90' 0,11	30 : 38,8	0,026	22,7	2,3	24,2	2,5	—	—
3 II	1	0,1	2	0,033	77,7	120	n. 90' 0,16	30 : 37,3	0,027	19,6	2,0	25,2	2,6	—	—
5 I	1	0,1	2	0,033	47,5	120	n. 120' 0,10	30 : 34,5	0,0290	13,0	1,3	27,4	2,8	—	—
5 II	1	0,1	2	0,033	38,9	120	n. 120' 0,19	30 : 34,7	0,0288	13,5	1,4	34,7	3,6	—	—

3. Versuche mit Rattenleberschnitten.

Nach Abbruch der Versuche zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme (S. 53) wurde die Abnahme der Acetessigsäure wie in den vorhergehenden Versuchen kolorimetrisch bestimmt.

Die Ergebnisse wurden in der vorstehenden Tabelle zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist die Abnahme der Acetessigsäure nach 85 Minuten nicht größer als nach 30 oder 15 Minuten. Die von der Versuchszeit unabhängige unregelmäßige Streuung der Werte für die Abnahme der Acetessigsäure deutet darauf hin, daß auch hier kein fermentativer Prozeß vorliegt.

Kontrollen mit gekochtem Gewebe wurden in diesem Falle nicht ausgeführt.

F. Versuche mit höheren β-Ketosäuren.

a) Darstellung der β-Ketomyristinsäure.

1. β-Ketomyristinsäureester[87]).

Zu Na-Acetessigester in Äther (2,3 g Na, 300 ccm Äther abs., 26 g Acetessigester) wurden 22 g (0,1 Mol) Laurinylchlorid tropfenweise unter kräftigem Umschütteln gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach Stehen über Nacht mit Wasser durchgeschüttelt. Zur Spaltung wurde die wässerige Lösung des Esters mit 45 ccm 10 %igem Ammoniak kräftig durchgeschüttelt, wobei sich ein gelbliches Öl abschied. Außerdem erhielten wir einen kristallinen Niederschlag vom Schmp. 104° (vermutlich Laurinsäureamid). Nach Erwärmen auf dem Wasserbad zur Vervollständigung der Reaktion wurde die ätherische Lösung des Esters mit Wasser, 10 %iger Salzsäure, Bisulfitlösung und nochmals mit Wasser gewaschen.

Der Ester destillierte bei 17 mm bei 195—198°,
bei 13 mm bei 159—165°.
(Zum Vergleich: Laurinylessigester Kp_{6mm} 155—173°, [63])
Laurinsäureäthylester Kp_{28mm} 163°).
Ausbeute: 7 g (29,8 % der Theorie).

2. Verseifung des Esters.

Der gewonnene Ester wurde mit der äquivalenten Menge methylalkoholischen Kalis verseift (0,1 m Lösungen, 2 % Überschuß Alkali). Nach 36stündigem Stehen wurde der Methylalkohol im Vakuum abgedampft und der gelbliche Rückstand, der sich bei längerem Stehen an der Luft dunkel färbte und zerfloß, mit Äther gewaschen. Diese Substanz, größtenteils β-ketomyristinsaures Kalium, wurde in wenig Wasser mit 2 n Schwefelsäure versetzt, wobei die β-Ketomyristinsäure sofort als weißer kristalliner Niederschlag ausfiel. Nach viermaligem Umkristallisieren aus Äthanol lag der Schmelzpunkt bei 76 bis 78 ° (Lit. 39—40 °). [63])

Die Analyse ergab:

2,632 mg Substanz: 6,63 mg CO_2; 2,59 mg H_2O;
$C_{14}H_{26}O_3$ Berechnet: C 69,43 H 10,74 Gef.: C 68,7 H 11,0.

Bei 78 ° setzte lebhafte CO_2-Entwicklung ein. Die Substanz gab mit Ferrichlorid deutliche Rotfärbung.

Aus den Mutterlaugen erhielten wir ein leicht gelbes Kristallisat vom Schmp. 38—39 °, das mit Ferrichlorid keine Rotfärbung gab.

Für unsere Versuche wurde die freie Säure in 0,1 n Natronlauge aufgenommen.

Die β-Ketostearinsäure wurde nach der gleichen Methode aus Palmitylchlorid dargestellt.

b) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.

Je 2 ccm einer etwa 0,1 molaren β-Ketomyristinsäure- bezw. β-Ketostearinsäurelösung wurden mit 5 ccm Hefesuspension (0,5 g Hefe) versetzt und im Thermostaten bei 30 ° bis zu einigen Stunden geschüttelt. In den 5 ausgeführten Versuchen zeigten die Ansätze, die Ketosäure enthielten, überhaupt keine Sauerstoffaufnahme, während in den Kontrollansätzen ohne Substrat lebhafte Eigenatmung stattfand.

c) Quantitative Bestimmung der Abnahme der β-Ketomyristinsäure.

Wir benutzten die für die Bestimmung der Abnahme der Acetessigsäure verwendete kolorimetrische Messung der Ferri-

chloridreaktion ebenfalls für die β-Ketomyristinsäure. In stark wasserhaltigen Lösungen entsprach jedoch das Verhältnis der Farbintensitäten nicht mehr dem Verhältnis der Konzentrationen der Lösungen. Der kolorimetrische Vergleich gelang aber, wenn in stark alkoholischen Lösungen gearbeitet wurde. Die Messung wurde wie bei den Acetessigsäureversuchen ausgeführt. Die Versuchslösungen wurden mit absolutem Alkohol im gleichen Verhältnis verdünnt; wir verwendeten 0,1 molare alkoholische Ferrichloridlösung. Das molare Verhältnis von Acetessigsäure zu Ferrichlorid betrug 1:1,6.

Vergleich verschiedener β-Ketomyristinsäure-Konzentrationen.

ccm 0,1 m Säurelösung	1:0,5	0,5:0,25	0,25:0,1	0,5:0,1
ccm Alkohol	4,0 4,5	4,5 4,75	4,75 4,9	4,5 4,9
ccm 0,1 m Ferrichlorid	1,6 0,75	0,75 0,4	0,4 0,2	0,4 0,2
Molarität der Lösungen	0,0151: 0,0087	0,0087: 0,0046	0,0046: 0,0019	0,0087: 0,0019
Kolorimeterwerte	42:66,5	64:114,7	48:100,4	35:140,6
Kolorimetr. best. Molarität	0,0151: 0,0095	0,0087: 0,0049	0,0046: 0,0022	0,0087: 0,0022
Fehler in %	+ 11,0	+ 10,5	+ 11,5	+ 11,3

Der Fehler beträgt bei einem Konzentrationsverhältnis von 2:1 ebenso wie bei demjenigen von 5:1 +11 %.

Versuche zur Bestimmung der Abnahme der β-Ketomyristinsäure.

In den Ansätzen zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme (S. 67) wurde nach Beendigung des Versuches (Schütteln im Thermostaten) die Abnahme der Säure quantitativ bestimmt. Die Versuchslösungen wurden mit absolutem Alkohol aus den Gefäßen herausgespült, zentrifugiert und mit Alkohol (abs.) auf 25 ccm Gesamtvolumen verdünnt, wie bei Acetessigsäure beschrieben, und kolorimetriert. Zur Kontrolle wurden wie bei den Acetessigsäureversuchen „Schnellversuche" ausgeführt. Mit Ausnahme von Versuch 1 wurden die Versuchslösungen wie bisher mit Kontrollen ohne Hefe verglichen. Versuch 1 gibt die Abnahme gegenüber Schnellversuchen an.

Sämtliche Versuchsansätze enthielten 2 ccm 0,1 molare Säurelösung und 5 ccm Hefesuspension. Ansätze = 0,03 molar.

Vergleich mit Schnellversuchen.

Versuche	Zeit in Min.	Kolorimeterwerte Schnellversuch : Versuch		Verhältnis der Säurekonzentrationen Schnellvers. : Versuch		Mehrabnahme in den Versuchen gegenüber den Schnellversuchen in %	
		a	b	a	b	a	b
1a	90	15 : 22,9	15 : 25,4	1 : 0,66	1 : 0,59	34,5	11,0
1b	270	15 : 25,6	—	1 : 0,59	—	41,4	—
1c	420	15 : 25,9	15 : 21,2	1 : 0,58	1 : 0,71	42,1	29,2

Zur Tabelle: Die Spalten a und b beziehen sich auf frische (a) und gekochte (b) Hefe.

Vergleich mit Kontrollösungen.

Versuch	Zeit in Min.	Kolorimeterwerte Kontrolle : Versuch			Molarität nach dem Versuch			Abnahme in %		
		a	b	Schn.	a	b	Schn.	a	b	Schn.
2a	60	30 : 47,0	30 : 46,8	30 : 41,2	0,019	0,019	0,022	36,2	35,9	27,2
2b	240	30 : 48,9	30 : 43,8		0,018	0,020		38,6	31,5	
2c	300	30 : 40,8	30 : 41,2		0,022	0,022		26,5	27,2	
3	60	5 : 7,3	5 : 11,7		0,021	0,013		31,5	57,3	
4a	160	15 : 30,3	15 : 32,0	30 : 30	0,015	0,014	0,03	50,5	53,1	0
4b	120	5 : 18	5 : 16,2		0,008	0,009		72,2	69,1	

In Versuch 4 wurde statt frisch verarmter Hefesuspension eine Suspension von mehrmals ausgewaschener Hefe verwendet.

Bei Unterteilung der Spalten in a, b und Schn. sind unter a die Werte für frische, unter b die für gekochte Hefe und unter Schn. diejenigen der Schnellversuche angeführt.

Da die Abnahme der β-Ketomyristinsäure in Versuchen mit gekochter und lebender Hefe durchschnittlich die gleiche ist, nach sehr langer Zeit sogar wieder eine Zunahme der Ketosäure zu beobachten ist, können wir schließen, daß auch hier kein fermentativer Verbrauch der β-Ketosäure vorliegt.

VI. Literaturverzeichnis.

1. Nencki u. Giacosa: H. S. Z. *4,* 325 (1880).
2. Schotten: H. S. Z. *8,* 60 (1883).
3. Salkowski: Ann. f. Chem. u. Pharm. *142,* 345 (1867).
4. Knoop, F.: Hofm. Beitr. *6,* 150 (1905).
5. Embden, G.: Hofm. Beitr. *6,* 59 (1905).
6. Embden, G.: Hofm. Beitr. *8,* 121 (1906).
7. Embden, Salomon u. Schmidt: Hofm. Beitr. *8,* 129 (1906).
8. Embden G. und Marx A.: Hofm. Beitr. *11,* 318 (1908).
9. Embden G. und Engel, H.: Hofm. Beitr. *11,* 323 (1908).
10. Embden G. und Wirth J.: Biochem. Z. *27,* 1 (1910).
11. Schwarz, L.: Dt. Arch. klin. Med. *76,* 233 (1903).
12. Baer u. Blum L.: Arch. exper. Pathol. *55,* 89 (1906).
13. Verkade u. Mitarbeiter: H. S. Z. *215,* 225 (1933).
14. Friedmann E.: Hofm. Beitr. *11,* 151 (1908).
15. Spiro K.: Biochem. Z. *127,* 297 (1922).
16. Dakin H. D.: J. of biol. Chem. *4,* 77, 419 (1908), *6,* 203, 221, (1909).
17. Embden G. u. Michaud L.: Hofm. Beitr. *11,* 332 (1908).
18. Dakin H. D. u. Wakemann A. I.: J. of biol. Chem. *8,* 105 (1906).
19. Dakin H. D. u. Wakemann A. I.: J. of biol. Chem. *9,* 329 (1911).
20. Mallèvre: Pflügers Arch. *49,* 460 *(1891).*
21. Pohl: Arch. f. exp. Pathol. *37,* 413 (1896).
22. Einbeck: Biochem. Z. *95,* 296 (1919).
23. Wieland H.: Ergebn. d. Physiol. *20,* 477 (1922).
24. Wieland, H.: Oppenheim. Handb. Bd. 2, S. 264, 2. Aufl.
25. Leathes J. B.: The Fats: monogr. London (1908).
26. Batelli u. Stern: Biochem. Z. *30,* 172 (1911), *31,* 478 (1911).
27. Einbeck: H. S. Z. *90,* 301 (1914) u. *81,* 145 (1913).
28. Batelli u. Stern: C. r. de la soc. biol. *83,* 1544 (1920).
29. Thunberg Th.: Skand. Arch. physiol. *35,* 163 (1918), Skand. Arch. physiol. *40,* 1 (1920), Zbl. Physiol. *31,* 98 (1918).
30. Dakin H. D.: Oxydations and Reduktions, monogr. 1922.
31. Mariott: J. of biol. Chem. *18,* 241, 507 (1914).
32. Clutterbuck u. Raper: Biolog. J. *19,* 385 (1925).
33. Friedmann E.: Biochem. Z. *27,* 119 (1910).
34. Blum L.: Arch. exp. Pathol. *56,* 92 (1906), *59,* 321 (1908).
35. Dakin H. D.: J. of biol. Chem. *88,* 43 (1923).
36. Neubauer: Verh. d. Kongr. f. inn. Med. 1910, 566.
37. Leathes, J. B.: J. of Physiol. 38, Proc. 27. Febr. 1909.
38. Kennavay u. Leathes: Lancet 1909, 95.

39. Hartley P. I.: J. of Physiol. *38*, 353 (1909).
40. Bloor: Physiol. Rev. *2*, 92 (1923).
41. Bloor: J. of biol. Chem. *56*, 711 (1923); *59*, 543 (1924); *68*, 33 (1926).
42. Jost H.: H. S. Z. *197*, 90 (1931).
43. Baer: Biochem. Z. *127*, 275 (1922).
44. Mackenzie: Transact. chem. soc. *81*, 1402 (1902).
45. Minkowsky: Arch. f. exp. Path. *31*, 85 (1893).
46. Pollack L.: Hofm. Beitr. 10, 232 (1910).
47. Geelmuyden: H. S. Z. f. physiol. Ch. *23*, 431 (1897).
48. Schwarz: Zbl. f. Stoffw. u. Verdauungskr. *1*, 1 (1909).
49. Embden G. u. Loeb A.: H. S. Z. *88*, 246 (1913).
50. Loeb A.: Biochem. Z. *47*, 118 (1912).
51. Knoop F.: H. S. Z. *67*, 489 (1910).
52. Ellinger u. Hensel: H. S. Z. *91*, 21 (1914).
53. Neubauer O. u. Warburg: H. S. Z. 70, *1*, (1910).
54. Knoop F.: Klin. Wochenschr. 1923 S. 60.
55. Bergell: 35. Kongr. f. inn. Med. 1907 S. 236.
56. Freise: Biochem. Z. *54*, 477 (1914).
57. Henze H.: H. S. Z. *189*, 121 (1930); *195*, 248 (1931).
58. Henze H. u. Müller R.: H. S. Z. *193*, 88 (1930).
59. Shaffer: J. of biol. Chem. *47*, 433, 449 (1931); *49*, 143 (1921); *54*, 399 (1922).
60. Shaffer u. Friedemann: J. of biol. Chem. *61*, 585 (1924).
61. Geelmuyden: Ergebn. d. Physiol. 1932, Bd. 43, S. 111.
62. Henze H. u. Stöhr: H. S. Z. *206*, 1 (1932).
63. Asahina J. u. Nakayama S.: Journ. pharm. soc. Japan 1925, Nr. 256, S. 3.
64. Blum L. u. Koppel: Ber. *44*, 3576 (1911).
65. Herrmanns: H. S. Z. 85, 233 (1913).
66. Friedmann E.: Biochem. Z. *35*, 40 (1911).
67. Knoop F. u. Gehreke: Biochem. Z. *146*, 63 (1925).
68. Geelmuyden: H. S. Z. *41*, 128 (1904); *58*, 255 (1908); *73*, 176 (1912).
69. Schwarz L.: Verh. d. Kongr. f. inn. Med. 1900, S. 840.
70. Magnus-Levy: Arch. f. exp. Path. *42*, 149 (1899).
71. Magnus-Levy: Arch. anat. Phys. Physiol. Abt. *1902*, 365; Beitr. z. chem. Physiol. *2*, 261 (1902).
72. Siehe auch Waldvogel: Acetonkörper, 1903.
73. Quick A.: J. of biol. Chem. *77*, 581 (1928).
74. Quick A.: J. of biol. Chem. *80*, 515 (1928).
75. Wieland H. u. Sonderhoff: Ann. *499*, 213 (1932).
76. Kühnau J.: Biochem. Z. 200, *61*, (1928).
77. Weiß u. Altai: Z. f. exp. Med. *47*, 606 (1925); *51*, 261 (1926).
78. Friedmann E.: Biochem. Z. *243*, 125 (1932); *244*, 26 (1932).
79. Friedmann E.: Biochem. Z. *55*, 281 (1914).
80. Oppenheimer: Handb. d. Fermentmethoden 3. Lief. S. 625 (1925).
81. Tollens: Ber. *17*, 66 (1884).
82. Harpuder K.: Verh. d. dt. Ges. f. inn. Med. 1925, S. 324; Ber. Ges. Physiol. *35*, 76 (1925).

83. Snapper u. Grünbaum u. Neuberg: Biochem. Z. *167*, 100 (1922).
Snapper u. Grünbaum: Biochem. Z. *201*, 464 (1928).
84. Ringer A. I. u. Jonas: J. of biol. Chem. *14*, 43 (1913).
85. Krebs: H. S. Z. *217*, 193 (1933).
86. Rosenfeld G.: D. med. Wochenschr. Nr. 40, 1885.
Zbl. f. inn. Med. 1223, XVI. (1895).
87. Fischer H.: Ann. *486*, 31 (1931).
88. Wieland H., Claren B.: Ann. *492*, 183 (1932).
89. Quagliariello G.: Atti R. Accad. naz. Lincei (9), 16, 387 (1932).
90. Atti R. Accad. naz. Lincei (6) 17, 476, (1933).
91. Warburg: Stoffwechsel der Tumoren.
92. Ljunggren, G.: Biochem. Z. *145*, 422 (1924).
93. Haehn H. u. Konthoff W.: Wschr. f. Brauerei *42*, 213 (1925).
Ber. *56*, 439 (1923); Chemie der Zelle und Gewebe *12*, 115 (1925).
94. Warburg: Biochem. Z. *142*, 317 (1923).
96. Lundin: Biochem. Z. *141*, 310 (1923); *142*, 463 (1923).
97. Ljunggren G.: Ber. ges. Physiol. *38*, 620 (1927).
98. Weiß St.: Ztschr. f. d. ges. exp. Med. *52*, 707 (1926).
99. Krebs: H. S. Z. *210*, 37 (1932).
100. Baer I., Blum L.: Schmiedebergs Ann. *55*, 89 (1906);
56, 92 (1906); *59*, 321 (1908); *62*, 129 (1910).
101. Butkewitsch u. Fedoroff: Biochem. Z. *207*, 302 (1929).

Lebenslauf.

Ich, Anneliese Hachfeld, wurde am 25. Juni 1907 in Treptow a/Rega als Tochter des Leutnants Willibald Hachfeld und seiner Ehefrau Anna geb. Schwarzwaeller geboren.

Vom Herbst 1914 bis Mai 1915 besuchte ich die Vorschule in Dessau, darauf bis Herbst 1920 die höhere Töchterschule in Darmstadt, und von Herbst 1920 bis Ostern 1926 das Mädchen-Realgymnasium der Liselotte-Schule in Mannheim. Nach dort abgelegter Reifeprüfung begann ich das Chemie-Studium im Mai 1926 an der Universität Heidelberg und unterzog mich dort im Herbst 1928 dem I. Verbandsexamen. Nach zwei Semestern an der Universität München setzte ich Herbst 1929 mein Studium an der Universität Freiburg i. Br. fort und bestand hier im Dezember 1930 die zweite Verbandsprüfung. Im Januar 1931 begann ich mit der Ausführung meiner Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. F. G. Fischer in der organischen Abteilung des Chemischen Universitäts-Laboratoriums Freiburg i. Br. Im Juli 1933 wurde die Arbeit abgeschlossen.

Freiburg i. Br., den 28. Juni 1934.